



Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny

Kierunek Farmacja

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

Karolina Banyś

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Bromatologii

Promotor pracy: dr hab. Barbara Bobrowska-Korczak

Warszawa, rok 2022

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką Pani dr hab. Barbary Bobrowskiej - Korczak, której serdecznie dziękuję za okazaną pomoc, cenne uwagi i sugestie, które wpłynęły na ostateczny kształt mojej pracy, jak również za zaangażowanie i życzliwość okazane mi podczas opieki naukowej.

W szczególny sposób pragnę podziękować moim rodzicom za ich wsparcie na każdej drodze mojej edukacji, motywację i anielską cierpliwość do mojej osoby.

Karolina Banyś

SPIS TREŚCI

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	5
1. Wstęp.....	5
2. Epidemiologia raka piersi w Polsce i na świecie, czynniki ryzyka.....	6
3. Nowotwory piersi - charakterystyka	10
4. Leki stosowane w leczeniu raka piersi, skutki uboczne	12
5. Zastosowanie nanotechnologii w leczeniu raka piersi	16
6. Możliwości wykorzystania związków pochodzenia roślinnego w terapii nowotworów	25
7. Genisteina	31
7.1. Struktura chemiczna, występowanie genisteiny.....	31
7.2. Metabolizm genisteiny	33
7.3. Aktywność biologiczna genisteiny.....	34
7.4. Genisteina, a rak piersi	36
8. Biomarkery	41
II. CEL PRACY	45
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	47
1. Materiał biologiczny do badań.....	47
2. Ocena procesu tworzenia i wzrostu guzów	51
3. Ocena histopatologiczna materiału biologicznego	51
4. Ocena zawartości metylowanych pochodnych nukleozydów (zasad) w moczu szczurów	51
5. Oznaczenie stężenia kreatyniny w moczu szczurów	53
6. Oznaczanie zawartości kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów	53
7. Oszacowanie aktywności $\Delta 5$ -desaturazy oraz $\Delta 6$ -desaturaz w surowicy krwi szczurów	54
8. Oszacowanie wskaźników aterogenności i trombogenności surowicy krwi szczurów	55
9. Oznaczenie zawartości kwasów: 5-, 12- i 15-HETE, 12-HEPE i HODE w surowicy krwi szczurów	56
10. Oznaczanie zawartości interleukiny 1, interleukiny 6 oraz metaloproteinazy 9 w surowicy krwi szczurów	57

11. Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań	57
IV. WYNIKI	59
1. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów	59
2. Wpływ suplementacji nano, mikro i makrogenisteiną na masę ciała badanych zwierząt i masę ich narządów	62
3. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian zawartości pochodnych nukleozydów/zasad w moczu szczurów	66
4. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA	86
5. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na aktywność enzymów szlaków metabolicznych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów	94
6. Aterogenność i trombogenność kwasów tłuszczowych zawartych w surowicy krwi szczurów suplementowanych nano, mikro i makrogenisteiną	97
7. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość wybranych metabolitów kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA	100
8. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość interleukiny 1, interleukiny 6, metaloproteinazy 9 w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA	104
V. DYSKUSJA	108
VI. WNIOSKI	122
VII. PIŚMIENNICTWO	124
VIII. STRESZCZENIE	156
1. Streszczenie w języku polskim	156
2. Streszczenie w języku angielskim	158

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wstęp

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym w populacji żeńskiej. Stanowi przyczynę około 23% wszystkich zachorowań u kobiet na raka, a śmiertelność z powodu tego nowotworu wynosi około 14% [1]. Aby skutecznie walczyć z rakiem piersi i wysoką śmiertelnością w tej jednostce chorobowej należałoby znacznie usprawnić działalność edukacyjną w zakresie zdrowia publicznego oraz zwiększyć świadomość kobiet w zakresie oznak i objawów raka piersi, a także zrozumienia znaczenia wczesnego wykrywania i leczenia, co może przyczynić się do szybszej diagnozy już na wczesnym etapie rozwoju choroby. Szybka diagnostyka, której możliwość przeprowadzenia w wielu krajach jest ograniczona, powinna być połączona ze skutecznym leczeniem. Chociaż dostępnych jest wiele leków o działaniu przeciwnowotworowym, ich skuteczność jest ograniczona, a stosowanie wiąże się z występowaniem wielu działań niepożądanych [2]. W tym kontekście ważne jest więc ciągle poszukiwanie nowych substancji, których obecność lub podwyższone stężenie pozwoli na wczesne wykrycie lub ocenę postępów choroby (wciąż poszukuje się nowych markerów zmian nowotworowych) oraz takich, które mogłyby być stosowane w terapiach przeciwnowotworowych.

W poszukiwaniu związków o działaniu przeciwnowotworowym dużą uwagę zwraca się na badania dotyczące genisteiny. Wykazano, że genisteina może wykazywać działanie przeciwnowotworowe min. poprzez indukowanie apoptozy, wpływ na cykl komórkowy, hamowanie procesu angiogenezy, aktywność antyproliferacyjną [3]. Z drugiej strony istnieją dane potwierdzające pronowotworowe działanie genisteiny, szczególnie w typach nowotworów hormonozależnych [4-8]. W związku z powyższym nadal nie wiemy komu i w jakich dawkach należy podawać genisteinę, aby osiągnąć pożądaną efekt zdrowotny, do końca nieznanym jest mechanizm jej działania na etapie inicjacji i progresji procesu nowotworowego. Istotna jest również odpowiedź na pytanie czy stosowanie suplementów zawierających genisteinę w kontekście ryzyka rozwoju choroby nowotworowej, jest dla kobiet bezpieczne. Kolejnym ważnym aspektem jest odpowiedź na pytanie w jaki sposób będzie działała genisteina w formach mikro i nano? Nanocząstki wykazują inną aktywność fizyczną,

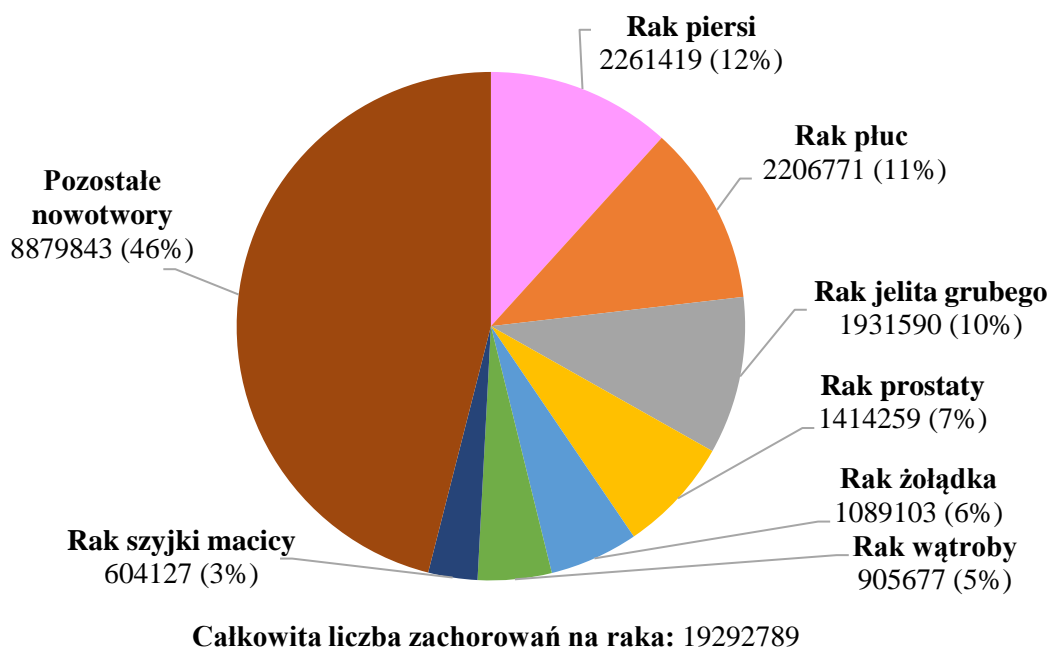
chemiczną i biologiczną niż makrocząsteczki [9]. Należy zaznaczyć, że w piśmiennictwie wciąż brakuje badań z przedstawionego zakresu.

W związku z powyższym celem badań była ocena działania nano, mikro i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem (DMBA) u szczurów. W pracy przedstawiono wyniki badań oceny działania w/w związków na wybrane biomarkery zmian patologicznych. Poznanie mechanizmów działania genisteiny może przyczynić się do zwiększenia bezpieczeństwa i możliwości jej wykorzystania.

2. Epidemiologia raka piersi w Polsce i na świecie, czynniki ryzyka

Zgodnie z raportem Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) w ciągu ostatnich 2 dekad liczba nowych przypadków zachorowań na nowotwory wzrosła dwukrotnie, z 10. mln w 2000 roku do ponad 19. mln w 2020 roku [10]. W 2020 roku rak piersi był najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie, wyprzedzając tym samym raka płuc (Rycina 1) [12]. Na całym świecie rak piersi został zdiagnozowany u około 2 mln osób, a liczba zgonów z tego powodu wyniosła 685 tys. [11, 12].

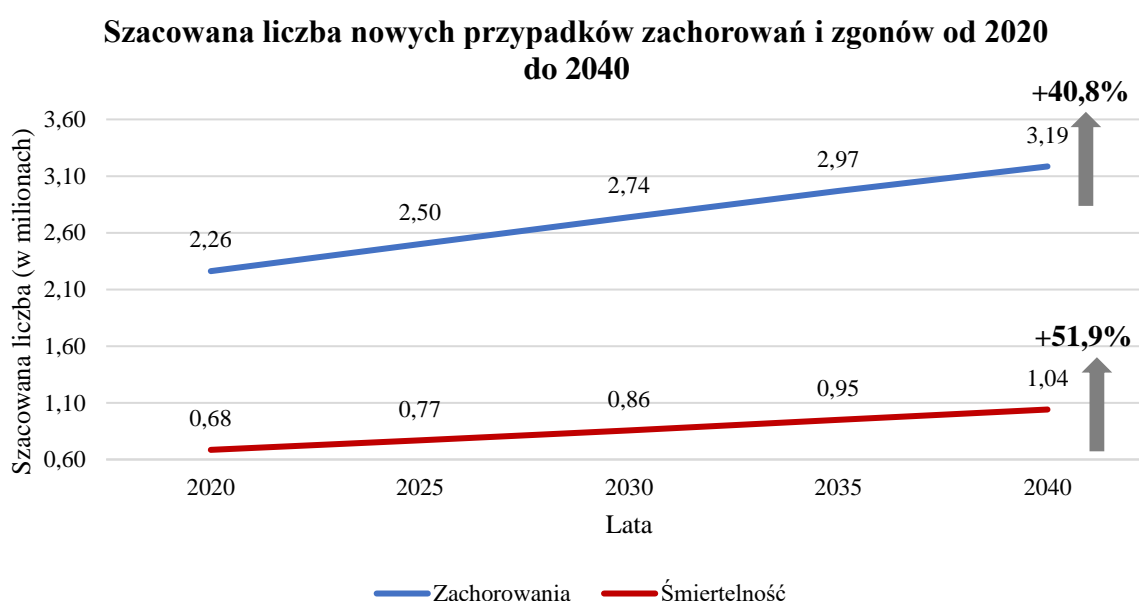
Liczba nowych przypadków zachorowań na nowotwory w 2020 roku



Rycina 1. Liczba nowych przypadków zachorowań na nowotwory na świecie w 2020 roku [12].

Spośród różnych kontynentów największą liczbę zachorowań na raka piersi odnotowano w Azji (45% wszystkich zachorowań na raka piersi na świecie), w tym w samych Chinach (około 18% wszystkich zachorowań na raka piersi na świecie), a następnie w USA (12% wszystkich zachorowań) [13]. W Polsce rocznie raka piersi diagnozuje się u ponad 20 tys. kobiet, a obecnie liczba chorych na ten typ nowotworu wynosi około 140 tys [14].

Liczba diagnozowanych przypadków raka piersi stale wzrasta. Prognozuje się, iż na świecie do 2040 roku liczba nowych przypadków zachorowań wzrośnie o 41%, a śmiertelność z powodu raka piersi wzrośnie o 52% (Rycina 2).

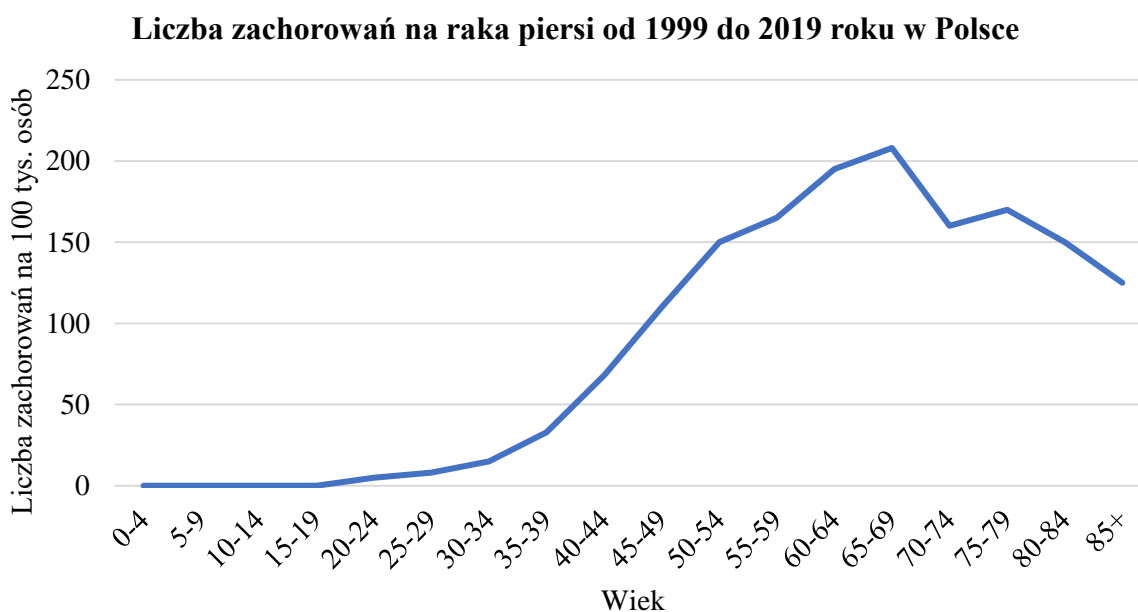


Rycina 2. Prognoza nowych przypadków zachorowań i zgonów z powodu raka piersi dla lat 2020-2040 [15].

Szacuje się, iż w Polsce do roku 2040 liczba zachorowań na raka piersi u kobiet wzrośnie o około 10% (z 24644 do 27041 nowych przypadków) [16], natomiast wzrost śmiertelności może wynieść nawet 31 % w porównaniu do roku 2020 [17]. Celem Światowej Organizacji Zdrowia WHO w ramach walki z rakiem piersi jest obniżenie globalnej umieralności z powodu tego nowotworu o 2,5% rocznie, co pozwoliłoby na uniknięcie w latach od 2020 do 2040 2,5 miliona zgonów z powodu raka piersi na świecie [11].

Przyjmuje się, że czynnikami sprzyjającymi rozwojowi nowotworów piersi są: m.in. płeć, wiek, obciążenia genetyczne, nieodpowiednia dieta, brak aktywności fizycznej, występowanie otyłości, późne macierzyństwo, krótki okres karmienia piersią, stosowanie

antykoncepcji czy hormonalnej terapii zastępczej [14]. Szacuje się, że około 0,5-1% przypadków zachorowania na nowotwory piersi dotyczy mężczyzn [14]. Ryzyko zachorowania i śmiertelności na raka piersi wzrasta wraz z wiekiem. Sporadycznie obserwuje się przypadki zachorowań ze skutkiem śmiertelnym u kobiet przed 20. rokiem życia. Największą liczbę zachorowań na nowotwory złośliwe piersi rejestruje się u kobiet między 50. i 69. rokiem życia (Rycina 3) [18].



Rycina 3. Liczba zachorowań na nowotwór piersi wśród kobiet w Polsce w latach 1999 - 2019 standaryzowana względem wieku [18].

tys.: tysiące

Około 5-10% nowotworów piersi ma charakter dziedziczny, pozostałe nowotwory powstają w wyniku samorzutnych mutacji (przemian genów) w ciągu całego życia. Prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi wśród kobiet wzrasta wraz z liczbą krewnych pierwszego stopnia (matka, siostra) chorych na ten nowotwór, zwłaszcza w młodym wieku. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, iż z nadmierne spożywanie tłuszczu, spożywaniem alkoholu oraz występowaniem nadwagi i otyłości, ma związek ze wzrostem ryzyka zachorowania na raka piersi [14].

W tabeli 1. przedstawione zostały wybrane czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi z uwzględnieniem względnego ryzyka [18].

Tabela 1. Czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi [18].

Ryzyko względne	Czynnik
>4.0	<ul style="list-style-type: none"> • Płeć żeńska • Wiek (>65, ryzyko zachorowania rośnie liniowo aż do 80. roku życia) • Mutacje genów BRCA1 i BRCA2 • Dwie lub więcej krewnych I-stopnia z rakiem piersi rozpoznanym w młodym wieku • Przebyty rak piersi w wywiadzie • „Wysoka gęstość” piersi • Atypowa hiperplazja
2.1-4.0	<ul style="list-style-type: none"> • Jedna krewna I-stopnia z rakiem piersi w wywiadzie • Ekspozycja na promieniowanie jonizujące • Wysoka gęstość kości (pomenopauzalna)
1.1-2.0	<ul style="list-style-type: none"> • Późna pierwsza donoszona ciąża (>30 lat)
Czynniki związane ze „stanem hormonalnym” (krążącymi hormonami)	<ul style="list-style-type: none"> • Wczesna menarche • Brak donoszonej ciąży • Brak karmienia piersią w wywiadzie • Długotrwałe stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych • Długotrwałe stosowanie HTZ
1.1-2.0	<ul style="list-style-type: none"> • Otyłość (pomenopauzalna)
Inne czynniki	<ul style="list-style-type: none"> • Przebyty rak endometrium, rak jajnika lub rak jelita grubego w wywiadzie • Wysokie spożycie alkoholu • Wzrost (wysoki) • Wysoki status społeczny

BRCA1: ang. Breast cancer early onset 1, gen wczesnego wystąpienia raka piersi 1; BRCA2: ang. Breast cancer early onset 2, gen wczesnego wystąpienia raka piersi 2; HTZ: hormonalna terapia zastępcza.

3. Nowotwory piersi - charakterystyka

Rak piersi jest chorobą heterogeniczną charakteryzującą się występowaniem różnorodnych zmian na poziomie molekularnym, genetycznym, fenotypowym i patologicznym. Heterogenność guzów wynika z działania czynników genetycznych, epigenetycznych i mikrośrodowiskowych, którym podlegają komórki nowotworowe podczas etapu inicjacji i progresji. Subpopulacje komórkowe z różnych części tego samego guza mogą różnić się pod wieloma względami, w tym szybkością wzrostu, immunogennością, zdolnością do tworzenia przerzutów i odpowiedzią na leczenie [19]. Za rozwój nowotworów piersi odpowiedzialne są mutacje w genach takich jak BRCA1, BRCA2 i P53 oraz różne inne czynniki w tym ekspozycja na estrogeny [19]. Estrogen (17 β -estradiol) jest kluczowym hormonem w fizjologii i patofizjologii funkcjonowania gruczołu piersiowego i głównie jest wydzielany przez jajniki. Estrogeny, jako hormony steroidowe, działają głównie poprzez wewnątrzkomórkowe receptory jądrowe [20]. Istnieją dwie formy receptora estrogenowego (ER) - ER α i ER β [21]. Estrogeny działając poprzez receptory ER α powodują wydłużanie i wzrost kanalików mlecznych w okresie dojrzewania oraz wydzielanie parakrynnego czynnika - amfiregulininy [22]. To z kolei stymuluje komórki zrębu ER α - do wydzielania innego czynnika parakrynnego, najprawdopodobniej czynnika wzrostu keratynocytów, który stymuluje komórki macierzyste sutka i ukierunkowuje je na wzrost przewodu [19]. Wyjaśnia to, w jaki sposób estrogeny, oprócz bezpośredniego działania na komórki z receptorami dodatnimi, mogą pośrednio stymulować proliferację komórek z receptorami ujemnymi.

Znanych jest kilka systemów klasyfikacji raka piersi. Klasyfikacja dotycząca stopnia zaawansowania choroby nowotworowej jest opisywana w skali od 0 do IV, gdzie stopień 0 określa nowotwór w bardzo wczesnej fazie rozwoju, przedinwazyjny (łac. *carcinoma in situ*, CIS), a stopień IV nowotwór zaawansowany z obecnością przerzutów odległych [23]. Do najważniejszych czynników warunkujących rokowanie pacjentów z nowotworem piersi zaliczamy: wielkość guza, typ histologiczny i stopień złośliwości, obecność przerzutów w węzłach chłonnych. Rodzaj leczenia zależy głównie od cech raka, określonych na podstawie biomarkerów [24]. Obowiązuje określenie ekspresji receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PR), ekspresji/amplifikacji receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2. (ang. *human epidermal growth factor receptor 2* - HER2) oraz ocena wskaźnika proliferacji (Ki-67) [25]. Biorąc pod uwagę wyniki badań aktywności biomarkerów dokonano podziału raka piersi na 4 podtypy: ER-dodatni luminalny A (LA); ER-dodatni

luminalny B (LB); HER2-dodatni (HER2); rak potrójnie ujemny (TNBC) (Rycina 4) [24-30].
Każdy z nich wymaga innego schematu postępowania terapeutycznego.

Podtyp molekularny	Luminalny A	Luminalny B	HER2	TNBC
ER/PR	+		-	
HER2	-	+		-
Częstotliwość ^a	50-60%	30%	10%	10-20%
Prognoza ^b	Dobra			Zła
Wskaźnik 5-letniego przeżycia ^c	94,3%	90,5%	84,0%	76,9%
Leczenie	Hormonoterapia			
			Anty HER2	
	Chemioterapia			

Rycina 4. Charakterystyka podtypów molekularnych raka piersi [24-30].

ER: receptor estrogenowy; PR: receptor progesteronowy; HER2: receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2; TNBC: potrójnie ujemny rak piersi.

Pomimo tego, że wskaźnik 5-letniego względnego przeżycia dla nowotworu piersi jest obiecujący i wynosi ponad 90% dla nowotworu Luminalnego, HER2-dodatniego około 84%, a dla TNBC około 77%, to w przypadku wystąpienia przerzutów względne przeżycie jest nadal niskie: 29% niezależnie od podtypu, a w przypadku przerzutowego TNBC może obniżyć się do 12% [24]. Dlatego tak ważne jest nieustanne poszukiwanie nowych skutecznych i bezpiecznych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu raka piersi.

4. Leki stosowane w leczeniu raka piersi, skutki uboczne

Wyboru odpowiedniego sposobu leczenia miejscowego lub systemowego dokonuje się indywidualnie, dla każdego pacjenta, z uwzględnieniem przewidywanej wrażliwości raka na poszczególne metody leczenia, ryzyka nawrotu, możliwych powikłań terapii i wieku oraz preferencji chorego [24]. Większość pacjentek z rakiem piersi jest poddawana operacji chirurgicznej w celu usunięcia nowotworu oraz radioterapii, w której wykorzystuje się wysokoenergetyczne promieniowanie rentgenowskie lub inne rodzaje promieniowania w celu zabicia komórek nowotworowych lub powstrzymania ich wzrostu [31]. Natomiast uzupełniające leczenie systemowe jest uzależnione od biologicznego podtypu nowotworu (Rycina 4). Leczenie systemowe można stosować przed operacją lub po jej przeprowadzeniu. Zgodnie z danymi FDA (FDA (ang. *U.S. Food and Drug Administration*) obecnie zatwierdzonych jest około 90 leków stosowanych w leczeniu raka piersi [32]. W leczeniu nowotworów piersi najczęściej wykorzystuje się następujące grupy leków: hormonoterapię, chemioterapeutyki, inhibitory CDK4/6, inhibitory mTOR, inhibitory PI3K, inhibitory kinazy tyrozynowej, przeciwciała monoklonalne [23].

Hormonoterapię stosuje się u chorych na raka piersi z ekspresją receptora estrogenowego (ER). U około 60-70% pacjentów z nowotworem piersi występuje ekspresja receptora ER i/lub progesteronowego (PR). W rakach piersi ER+ estrogeny hamują apoptozę i stymulują proliferację komórek nowotworowych [33]. Celem leczenia hormonalnego jest zahamowanie działania proliferacyjnego estrogenów poprzez zablokowanie ich połączenia z receptorem estrogenowym albo obniżenie ich poziomu w surowicy i komórkach nowotworowych. W tej grupie leków stosuje się tamoksifen - selektywny modulator receptora estrogenowego, niesteroidowe inhibitory aromatazy (Anastrozol i Letrozol), steroidowe inhibitory aromatazy (Eksemestan) oraz analogi hormonu uwalniającego gonadotropinę (Goserelina, Leuprorelina i Tryptorelina) [24, 33]. Główne objawy uboczne stosowania w/w grupy leków to: powikłania zakrzepowo-zatorowe, występowanie raka błony śluzowej trzonu macicy, bóle kostno-mięśniowe, osteoporoza z powikłaniami w postaci złamań kości, uderzenia gorąca, plamienia i krwawienia z dróg rodnych, incydenty naczyniowe w mózgu. Częstość objawów ubocznych zwiększa się z czasem obserwacji [34].

Chemioterapia jest wskazana u prawie wszystkich chorych na raka trójujemnego, HER2+, a także w niektórych przypadkach u osób z rakiem luminalnym o fenotypie HR+/HER2- [26]. Stosowana jest u pacjentów, u których doszło do progresji choroby po

zastosowaniu hormonoterapii [35]. U pacjentek w zaawansowanym rakiem piersi z przerzutami zazwyczaj stosuje się terapię złożoną z co najmniej dwóch różnych chemioterapeutyków [24]. Do grupy chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu raka piersi należą: antybiotyki antracyklinowe, wyizolowane z grzybów *Streptomyces perceretus* oraz *Streptomyces caesius*: Doksorubicyna, Epirubicyna, Mitoksantron; taksany: Paklitaksel otrzymywany z Cisa amerykańskiego (*Taxus brevifolia*), Docetaksel wyizolowany z Cisa Europejskiego (*Taxus baccata*); środki alkilujące: Cyklofosfamid, Kapecytabina, Fluorouracyl (5-FU); pochodne platyny: Karboplatyna, Cisplatyna, Oksaliplatyna; antymetabolity: Metotreksat; alkaloidy barwinka różowego (*Vinca rosea*): Winorelbina, Winblastyna, Winkrystyna; inne: Gemcytabina, Mitomycyna C, Mesylan eribuliny, Iksabepilon [36]. Leki te charakteryzują się złożonym mechanizmem działania min.: zaburzają syntezę i stabilność kwasów nukleinowych, stymulują produkcję reaktywnych form tlenu, hamują podział komórek, stymulują apoptozę, hamują proces naprawy DNA [35, 37-40]. Działania niepożądane chemioterapii to: powikłania skórne, wyłysienie, zapalenie śluzówek, nudności i wymioty, pneumotoksyczność, niedokrwistość, neutropenia, gorączka neutropeniczna, kardiotoxycyzność, nefrotoksyczność, neurotoksyczność. Stosowanie takich leków jak: Docetaksel, Cyklofosfamid, Doksorubicyna, związane jest z ponad 20% ryzykiem wystąpienia gorączki neutropenicznej [41, 42]. Pochodne platyny ze względu na ich wysoką hepatotoksyczność są stosowane tylko i wyłącznie u pacjentów, u których standardowa chemioterapia nie przynosi oczekiwanego efektu. Kardiotoxycyzność w zależności od terapii może wystąpić nawet u 29% pacjentów, a ryzyko utrzymuje się nawet do 30 lat od zakończenia terapii (kardiotoxycyzność późna przewlekła) [43]. Kolejnym pojawiającym się powikłaniem są neuropatie, a polineuropatia obwodowa w stopniu G2-G4 dotyczy około 13-27% chorych leczonych Paclitakselem i Docetakselem w schematach sekwencyjnych z antracyklinami [44].

Kolejną grupą leków stosowanych w terapii nowotworów piersi są inhibitory kinaz zależnych od cyklin (CDK) 4 i 6. W raku piersi z dodatnią ekspresją receptora estrogenowego bardzo często występuje aktywacja osi CDK4/CDK6/E2F, która prowadzi do stymulacji i proliferacji komórek. Jednym z mechanizmów działania leków p/nowotworowych jest supresja aktywności kinaz CDK4 i CDK6 [45]. W obrębie tej grupy wyróżniamy trzy preparaty: Palbociclib, Ribociclib i Abemaciclib. Skutkiem stosowania w/w leków jest poprawa przeżycia wolnego od progresji u chorych z ER-dodatnim, HER2-ujemnym rakiem piersi [46-52]. Najczęstszymi działaniami toksycznymi leków z grupy inhibitorów kinaz CDK4/6 są neutropenia, niedokrwistość i leukopenia, ale, co należy podkreślić, poddają się one leczeniu [46-52].

Reprezentantem grupy leków należących do selektywnych inhibitorów szlaku mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) jest Ewerolimus, makrolid zwany Rapamycyną lub Sirolimusem [53]. Wytwarzany jest przez bakterie *Streptomyces hygroscopicus*. Jest on inhibitorem kinazy mTOR, która bierze udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Ewerolimus wykazuje aktywność antyproliferacyjną i antyangiogenną [54]. Zahamowanie sygnału proliferacji prowadzi do zatrzymania komórek w fazie G1 cyklu komórkowego [55]. Lek ten znalazł zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka piersi z ekspresją receptorów hormonalnych i HER2. Do najczęstszych powikłań występujących podczas stosowania Ewerolimusu należą: zapalenie śluzówek jamy ustnej, niedokrwistość, duszność, hiperglikemia, zmęczenie [55].

Alpelisib jest inhibitorem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, hamuje on szlak sygnałowy PI3K/AKT, ogranicza wzrost zmiany nowotworowej i powoduje zwiększenie transkrypcji receptora estrogenowego (ER) w komórkach raka piersi [56]. U około 40% pacjentów z nowotworem hormonozależnym, HER2-ujemnym występuje mutacja w genie PI3KCA i jest ona odpowiedzialna za hormonooporność i niekorzystne rokowanie. Działania niepożądane związane ze stosowaniem Alpelisibu obejmują: biegunkę, nudności, brak łaknienia i wysypkę. Podczas stosowania Alpelisibu konieczne jest monitorowanie poziomu cukru, albowiem może dochodzić do hiperglikemii [57].

W leczeniu raka piersi znalazły również zastosowanie takie leki jak: Lapatynib, Neratynib, Tukatynib [24], które są inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI). Kinaza tyrozynowa ogrywa istotną rolę w przebiegu licznych procesów komórkowych, między innymi w proliferacji, apoptozie i transkrypcji. Poszczególne klasy leków należących do inhibitorów kinazy tyrozynowej są ukierunkowane przeciwko swoistym receptorom [58]. Lapatynib jest podwójnym TKI EGFR/HER2 blokującym aktywację zarówno HER1, jak i HER2 [59]. Neratynib jest nieodwracalnym inhibitorem TKI, skierowanym przeciwko HER1, HER2 i HER4 [60]. Tukatynib, jest inhibitorem kinazy tyrozynowej o wysokiej selektywności w stosunku do HER2 [61]. Najczęstszymi występującymi działaniami niepożądanymi wynikającymi ze stosowania w/w leków są: zaburzenia żołądkowo-jelitowe (biegunka, nudności i wymioty), zaburzenia dermatologiczne (wysypka), erytrodyzestezja dłoniowo-podeszwowa, bóle głowy, zmęczenie, zapalenie jamy ustnej, hepatotoksyczność i kardiotoxyczność [58, 60].

Ostatnią grupą leków, które znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu raka piersi są przeciwciała monoklonalne, czyli leki biologiczne. W leczeniu nowotworów piersi wyróżniamy dwie grupy, pierwsza z nich jest skierowana przeciw receptorom HER2 (Trastuzumab, Pertuzumab), a druga znalazła zastosowanie w immunoterapii biologicznej (Atezolizumab, Durvalumab, Pembrolizumab) [24]. Pierwsze opracowane przeciwciało ukierunkowane na HER2, trastuzumab, zostało zatwierdzone przez FDA do stosowania w lecznictwie w 1998 roku [62]. Trastuzumab ma zdolność specyficznego wiązania się z subdomeną IV zewnątrzkomórkowego HER2, hamuje nadmierną proliferację komórek i powoduje zahamowanie procesu angiogenezy [63-66]. Do najczęstszych działań niepożądanych związanych ze stosowaniem trastuzumabu należą gorączka, dreszcze, dolegliwości bólowe oraz osłabienie i nudności, ale najpoważniejsze jest kardiotoksyczne działanie leku [67].

Podsumowując należy podkreślić, że dostępne terapie przeciwnowotworowe nie są wystarczająco skuteczne, a stosowanie ich jest związane z występowaniem wielu działań niepożądanych, które nierzadko prowadzą do śmierci. Rak piersi jest chorobą heterogeniczną i pomimo postępu medycyny i wynalezienia leków celowanych obecne stosowane terapie nadal są mało specyficzne, co zasadniczo wpływa na niewystraczającą skuteczność terapii [68]. Kolejną istotną przyczyną niepowodzenia stosowania systemowej terapii przeciwnowotworowej w raku piersi jest zjawisko nabywania oporności na leczenie, które może wystąpić nawet u 25% pacjentów [69, 70]. Oporność wielolekowa nowotworów może być uwarunkowana genetycznie, albo wytworzyć się wtórnie podczas leczenia [71]. Najczęściej pojawia się podczas leczenia cytostatykami oraz przeciwciałami monoklonalnymi [72, 73]. Wysokie ryzyko nawrotów jest następnym czynnikiem wpływającym negatywnie na powodzenie terapii przeciwnowotworowej raka piersi. Dotyczy to przede wszystkim kobiet po menopauzie, przy czym najwyższe ryzyko występuje u pacjentek powyżej 50 roku życia. We wskazanej grupie wiekowej wystąpienie miejscowego nawrotu raka piersi po leczeniu oszczędzającym pierś wynosi 30% [69, 70]. Ryzyko nawrotu miejscowego i odległego jest zależne od stopnia zaawansowania oraz typu nowotworu i może utrzymywać się do 20 lat od zakończenia leczenia. U pacjentów z rakiem piersi ER+ i występującymi przerzutami do węzłów chłonnych ryzyko nawrotu odległego wynosi 41% [74]. Do czynników wpływających na ryzyko nawrotu raka piersi i zgonu zalicza się: wielkość guza, typ histologiczny, stan pachowych węzłów chłonnych, ekspresję HER2, ekspresję receptorów steroidowych, wzrost wskaźnika proliferacji Ki67 oraz stopień występowania mutacji. Ponadto udowodniono istotny

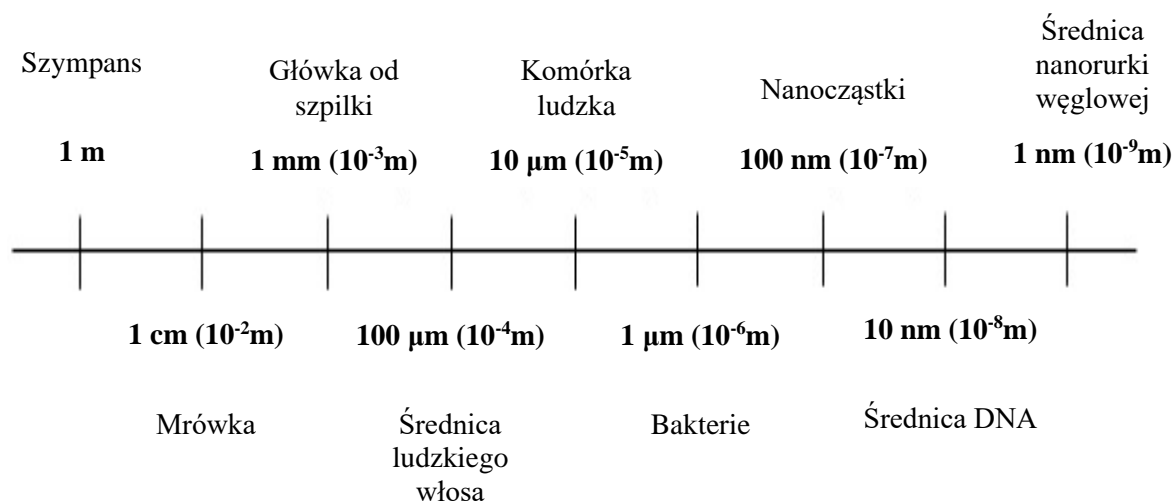
wpływ otyłości, która często jest spowodowana nieodpowiednią dietą oraz zmianą stężenia estrogenów na złe rokowanie u pacjentek przed menopauzą [75-77].

Biorąc pod uwagę powyższej przedstawione następstwa stosowanych terapii w leczeniu raka piersi oraz niekorzystne rokowania, istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych. Dążenia do odkrycia optymalnych rozwiązań, które zwiększą skuteczność, bezpieczeństwo i efektywność leczenia, obecnie koncentrują się wokół wielu możliwości, w tym:

- poszukiwaniu ulepszonych form farmaceutycznych obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych,
- poszukiwaniu nowych związków przeciwnowotworowych pochodzenia naturalnego lub syntetycznego,
- poszukiwaniu nowych cząsteczek działających w oparciu o selektywne mechanizmy działania w danym typie raka piersi,
- manipulowanie układem odpornościowym, tak, aby sam aktywował odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym [78].

5. Zastosowanie nanotechnologii w leczeniu raka piersi

Nanotechnologia jest szybko rozwijającą się dziedziną nauki i znalazła zastosowanie w farmacji i medycynie, między innymi w pozyskiwaniu nowych bezpieczniejszych oraz skuteczniejszych terapii [79]. Precyzyjne dostarczanie substancji aktywnej terapeutycznej tylko do chorobowo zmienionych obszarów, w dawce nie większej niż jest to konieczne do wywołania efektu terapeutycznego, ma na celu obniżenie zużycia leków, a tym samym również zmniejszenie skutków ubocznych danej terapii, poprawiając przy tym skuteczność i efektywność leczenia pacjentów [80 - 87]. Biorąc pod uwagę wielkość miary nanocząstkami określa się materiały, które przynajmniej w jednym wymiarze mają rozmiar jednej tysięcznej metra (10^{-9} m), czyli jedną miliardową część metra (= 0,000000001), lub też w rozkładzie wielkości cząstek przynajmniej 50% cząstek jest w skali nanometrycznej [86, 87]. Rozmiary wybranych obiektów w skali od 1m do 1nm przedstawiono na rycinie 5 [85].



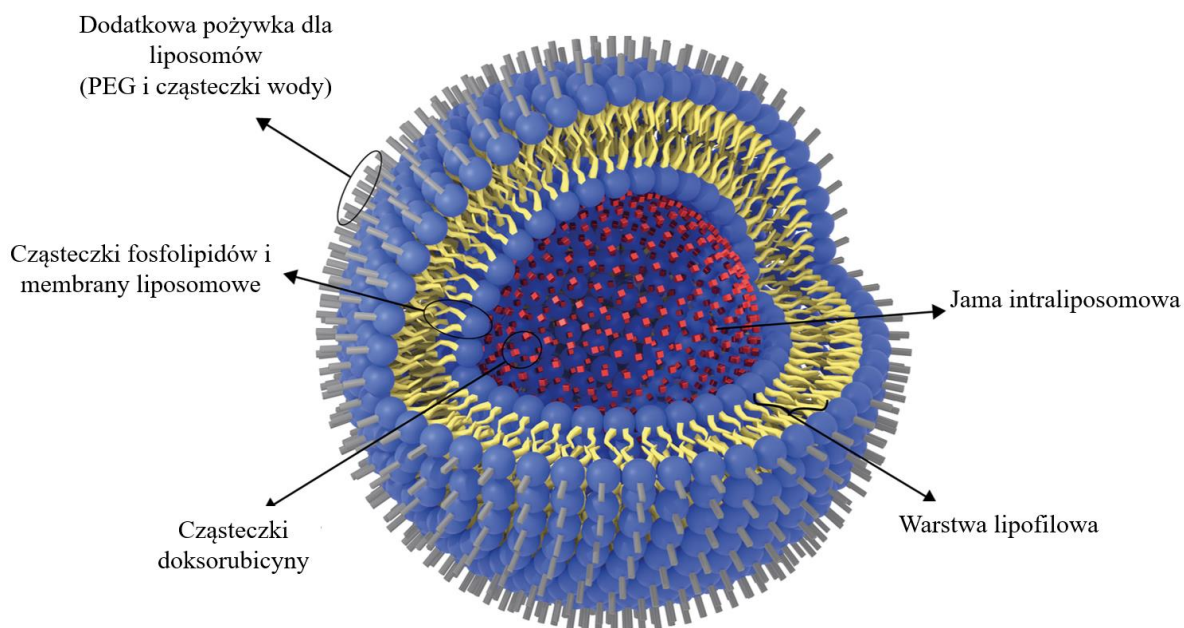
Rycina 5. Rozmiary wybranych obiektów w skali od 1m do 1nm [85].

m: metr; cm: centymetr; mm: milimetr; µm: mikrometr; nm: nanometr.

Nanocząstki łatwiej i szybciej penetrują do organizmu czy zmienionej chorobowo tkanki, ponieważ redukcja do skali nano powoduje, że mają one inne właściwości fizykochemiczne i biologiczne niż właściwości materiałów w skali mikro i makrometrycznej [84]. Dzięki temu nanocząstki są przedmiotem wielu badań i wiąże się ogromne nadzieje, co do możliwości ich zastosowania w terapii nowotworów, w tym raka piersi, jako alternatywa dla obecnie stosowanych terapii [82, 84-85]. W porównaniu z konwencjonalnymi terapiami przeciwnowotworowymi nanocząstki mają wiele zalet, takich jak mniejsza degradacja leku podczas transportu dzięki ochronie przed środowiskiem chemicznym lub biologicznym *in vivo*, zminimalizowanie działań niepożądanych dzięki lepszej biokompatybilności i lepszemu ukierunkowaniu oraz zwiększenie dawki chemioterapeutyku dostarczanego do tkanki nowotworowej [88]. Nanotechnologia zdaje się mieć również duży potencjał w skutecznym eliminowaniu komórek macierzystych raka piersi, które prawdopodobnie są ważnym czynnikiem inicjacji, nawrotów i oporności na chemioradioterapię raka piersi [89]. Warto podkreślić, że z jednej strony nanostruktury mogą być wykorzystywane, jako nośniki już znanych substancji leczniczych, a z drugiej strony prowadzone są badania nad znalezieniem nowych związków, które stosowane w skali nano, mogą okazać się skuteczne w leczeniu pacjentów z chorobą nowotworową.

Na liście leków już zarejestrowanych do stosowania w leczeniu pacjentów z rakiem piersi, w których jako nośniki substancji leczniczych stosuje się nanostruktury, znajdują się: Doxil firmy Janssen Products i Abraxane firmy Abraxis Bioscience [90].

Doxil, zawierający w swoim składzie doksyrubicynę w nanoliposomach z polietylenoglikolu (PEG), był pierwszym tego typu lekiem, zatwierdzonym w 1995 roku w przez Agencję Żywności i Leków (FDA) do stosowania przez pacjentów (Rycina 6). Lek ten został zarejestrowany między innymi w leczeniu raka piersi w monoterapii i terapii skojarzonej [90, 91]. Zamknięcie doksyrubicyny w nano liposomach powoduje spowolnienie uwalniania substancji czynnej, dzięki czemu ma ona stabilny profil uwalniania bez wysokich stężeń maksymalnych w osoczu, a szczytowe stężenie głównego kardiotoksycznego metabolitu, występuje później i jest niższe w porównaniu do konwencjonalnej doksyrubicyny [92, 93]. Podawanie doksyrubicyny w formie nano zmienia parametry farmakokinetyczne substancji czynnej, powodując mniej powikłań sercowo naczyniowych, w porównaniu z postacią leku w skali makro, co zostało potwierdzone w badaniu z udziałem 297 pacjentów leczonych na przerzutowego raka piersi. W grupie osób, otrzymujących Doxil, kardiotoksyczność wystąpiła u 6% pacjentów, natomiast w grupie pacjentów stosujących doksyrubicynę w postaci makro u 21% badanych [94]. W analizie retrospektywnej wykazano, że efektem zastosowania leku w postaci nano było, istotne zwiększenie liczby responsywnych pacjentów (31% vs. 11%), jak również wydłużenie czasu wolnego od progresji choroby [95].



Rycina 6. Struktura nanoliposomu zawierającego doksyrubicynę (<100 nm) - preparat Doxil® [96].

PEG: glikol polietylenowy.

Kolejnym przykładem wykorzystania nanomateriałów, jako nośników substancji leczniczych było połączenie Paklitakselu z nano albuminą (Nab-Paklitaxsel). Komplex ten zarejestrowany został do stosowania w leczeniu w 2005 roku pod nazwą Abraxan. Jednym z objawów ubocznych stosowania paklitakselu jest neutropenia. W badaniu klinicznym z udziałem 422 pacjentów, wykazano, że u pacjentek stosujących Nab-Paklitaxsel ryzyko wystąpienia ciężkiej neutropenii było istotnie niższe w odniesieniu do kobiet stosujących konwencjonalne preparaty (odpowiednio 1,4% pacjentek vs. 7,5% pacjentek) [97].

Obecnie prowadzonych i już zakończonych jest szereg badań klinicznych nad preparatami, w których znane substancje aktywne, o działaniu przeciwnowotworowym, są umieszczone w nanomolekułach. W/w badania dotyczą zastosowania min.: doksyubicyny, paklitakselu, mikroRNA, cisplatyny, docetakselu, przeciwciał monoklonalnych (Tabela 2) [98, 99].

Tabela 2. Przykłady zakończonych i trwających badań klinicznych substancji aktywnych o działaniu przeciwnowotworowym zawartych w nanostrukturach [90, 99].

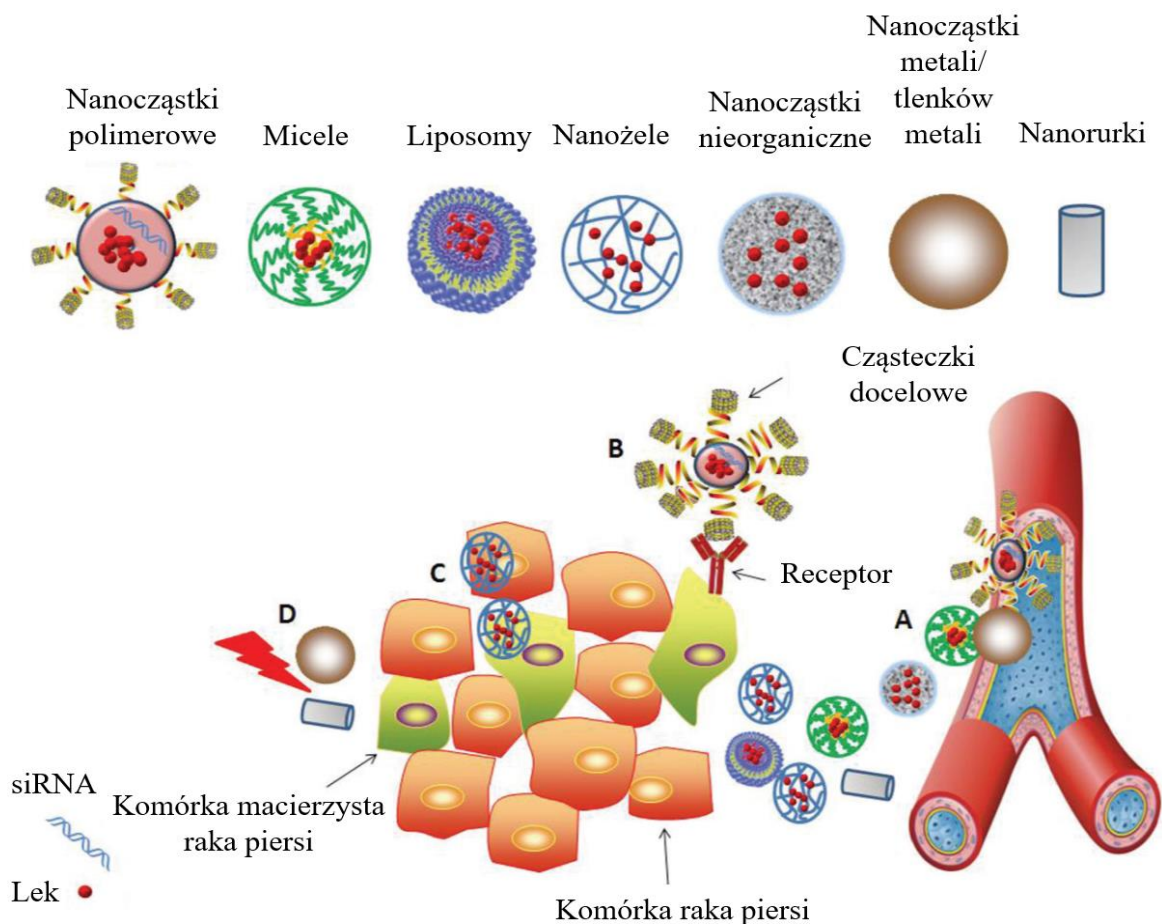
Nazwa preparatu	Nazwa substancji aktywnej	Nazwa firmy farmaceutycznej	Etap badania klinicznego
Myocet®	Doksyubicyna	Sopherion Therapeutics	Zakończone
NK-105	Paklitaxsel	Nippon Kayaku	Zakończone
Genexol®-PM	Paklitaxsel	Samyang Biopharmaceuticals	Zakończone
LEP-ETU	Paklitaxsel	INSYS Therapeutics	Zakończone
Xyotax®	Paklitaxsel	Dana-Farber Cancer Institute	Zakończone
ThermoDox®	Doksyubicyna	Celsion	Zakończone
Liposomal annamycin	Doksyubicyna	New York University, School of Medicine	Zakończone
Rexin-G	MikroRNA	Epeius Biotechnologies	Zakończone
SPI-077	Cisplatyna	LiPlasome Pharma	Zakończone
Nanoxel®	Docetaxsel	Fresenius Kabi Oncology	Zakończone
Kisqali®	Ribociclib	Novartis	III Faza

Vzenios®	Abemaciclib	Eli Lilly	III Faza
Ibrance®	Palbociclib	Pfizer	III Faza
Enhertu®	Trastuzumab-deruxtcan	Daiichi Sankyo Europe GmbH	III Faza

Przykłady nanomolekuł stosowanych, jako nośniki substancji leczniczych przedstawiono w tabeli 3 i na rycinie 7 [88].

Tabela 3. Przykłady nanomolekuł stosowanych, jako nośniki substancji leczniczych [88].

Rodzaj nanomolekuły	Rozmiar [nm]	Możliwości zastosowania
Polimery biodegradowalne	10-100	Plazmidy DNA, białka, peptydy, niskocząsteczkowe substancje organiczne
Ceramiczne	< 100	Białka, DNA, chemioterapeutyki, wysokocząsteczkowe związki organiczne
Metale	< 50	Białka, DNA, chemioterapeutyki
Polimery miceralne	< 100	Białka, DNA, chemioterapeutyki
Dendrymery	< 10	Chemioterapeutyki, związki o działaniu przeciwbakteryjnym, antywirusowym, DNA
Liposomy	50-100	Chemioterapeutyki, białka, DNA
Fosforokrzemian wapniowy	20-60	Chemioterapeutyki, RNA, związki stosowane w diagnostyce



Rycina 7. Struktury nanomolekuł stosowanych w farmacji i medycynie, jako nośniki substancji leczniczych w raku piersi [100].

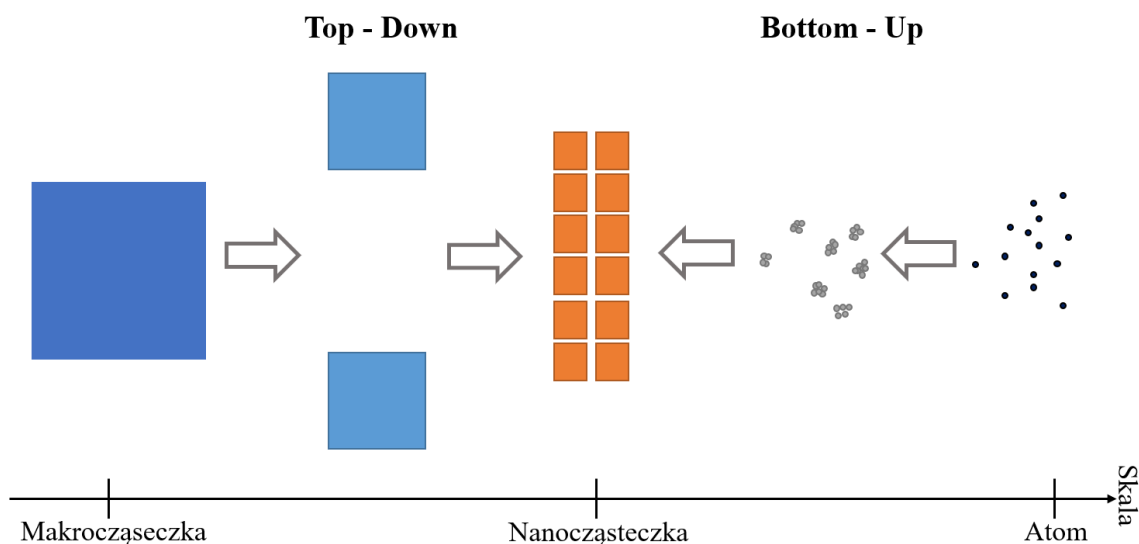
Strategie poprawy skuteczności terapeutycznej w raku piersi obejmują, ale nie są ograniczone do: (A) biernego gromadzenia się nanocząstek w miejscu guza dzięki zwiększonej przepuszczalności naczyniowej; (B) zwiększonego wchłaniania nanocząstek na drodze endocytozy wspomaganą przez receptory; (C) dostarczania leków w postaci nanocząstek skierowanych jednocześnie na komórki macierzyste raka piersi i komórki raka piersi; (D) zastosowania metali lub tlenków metali oraz terapii termicznej z wykorzystaniem nanorurek węglowych.

Celem prowadzonych badań jest uzyskanie większej skuteczności działania już znanych substancji leczniczych oraz obniżenie występowania ich działań niepożądanych, a spodziewanym efektem będzie osiągnięcie postępów w obszarze leczenia raka piersi.

Drugim obszarem prowadzonych obecnie badań, jest poszukiwanie związków, które w formie nano będą mogły być stosowane w terapii choroby nowotworowej. Wciąż poznawane są mechanizmy działania w/w związków na rozwój i przebieg procesu nowotworowego.

Istnieje wiele sposobów otrzymywania struktur nanometrycznych. Najbardziej ogólny podział metod wytwarzania nanostruktur dzieli je na metody „top-down” (z góry - do dołu)

oraz „bottom-up” (z dołu - do góry) (Rycina 8) [85, 101]. Metody „top-down”, opierają się na podziale materiału makroskopowego na mniejsze części wykorzystując do tego celu procesy fizyczne. Polegają na rozdrobnieniu wyjściowego materiału w kontrolowany sposób tak, aby jego końcowy rozmiar zawierał się w przedziale 1-100 nm. Do metod tych zalicza się następujące techniki: wysokoenergetyczne mielenie, procesy litograficzne czy też konwencjonalną obróbkę materiałów [86]. W metodach „bottom-up”, struktury nanometryczne otrzymuje się z pojedynczych atomów lub cząsteczek bazując najczęściej na procesach chemicznych. Metody te polegają na tzw. budowie od podstaw, czyli atom po atomie. Do tworzenia nanostruktur metodami „bottom-up” wykorzystuje się m.in.: osadzanie z fazy gazowej, osadzanie wspomagane plazmą, epitaksję z wiązki molekularnej, metody wykorzystujące fazę ciekłą, metody koloidalne, metody zol-żel oraz osadzanie elektrolityczne [86].



Rycina 8. Metody wytwarzania nanostruktur [85, 101].

Przykłady badań nanozwiązków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym przedstawione zostały w tabeli 4.

Tabela 4. Przykłady badań nanozwiązków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym w raku piersi.

Badany związek	Model	Rezultat	Referencje
Cynk	In vivo - szczury indukowane 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem	Obniżenie zapadalności, zmniejszenie wielkości guzów	102

	In vitro - MCF-7, MDA-MB-231	Indukcja apoptozy	103
Tlenek cynku	In vitro - MCF-7, T47D	Zależne od dawki zahamowanie wzrostu komórek, indukcja apoptozy	104
	In vitro - TNBrCa	Indukcja apoptozy	105
	In vitro- MCF-7, MCF 10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, CC70, SUM-159	Uszkodzenie DNA w komórkach nowotworowych	106
Srebro	In vivo - myszy z komórkami MDA-MB-231	Zmniejszenie wielkości guzów	106
	In vitro - MCF-7	Zależny od dawki wzrost intensywności apoptozy i autofagii	107
	In vitro - HUVEC	Zakłócenie proliferacji komłorek śródbłnka i migracji komórek, indukcja nieszczelności bariery śródbłonkowej	108
Platyna	In vivo - myszy nagie BALB/c indukowane komórkami 4T1-Luc	Indukcja przerzutów	108
Tlenek tytanu	In vitro - MDA-MB-231, Hs579T	Indukcja apoptozy	109
	In vitro - MDA-MB-231	Zależna od dawki redukcja ROS	110
Tlenek ceru	In vitro - MCF-7	Zwiększenie cytotoksyczności w komórkach nowotworowych	111
	In vitro - MDA-MB-231, MDA-MB468	Indukcja apoptozy	112
Złoto	In vivo - myszy indukowane 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem	Zmniejszenie ognisk komórek nowotworowych, kontrola raka piersi	113

Bobrowska-Korczak i wsp. [102] przeprowadzili badania oceny wpływu nanocynku na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem

u szczurów szczepu Sprague-Dawley. W badaniu wykazano, iż suplementacja zwierząt nanocynkiem spowodowała zahamowanie rozwoju procesu nowotworowego poprzez działanie na występowanie i wzrost guzów (obniżenie wielkości masy guzów oraz obniżenie liczby guzów w grupie).

W badaniach przeprowadzonych przez Boskabadi i wsp. [103] z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-7, MDA-MB-231 stwierdzono, iż nanotlenek cynku wpływał na metabolizm komórek nowotworowych, zaburzał ich homeostazę i indukował apoptozę. Natomiast wyniki badania Shandiz i wsp [104] wykazały, iż związek ten indukował apoptozę komórek raka piersi linii: MCF-7 i T47D.

W badaniu przeprowadzonym przez Swanner i wsp. [106] na liniach komórkowych: MCF-7, MCF 10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, CC70, SUM-159 oraz z udziałem myszy BALB/c indukowanych komórkami MDA-MB-231 wykazano, iż nanosrebro spowodowało rozległe uszkodzenia DNA komórek nowotworowych oraz hamowało wzrost guzów. Alkawmani i wsp. [107] wykazali, że jony nanosrebra nie tylko mogą indukować apoptozę, ale również autofagię.

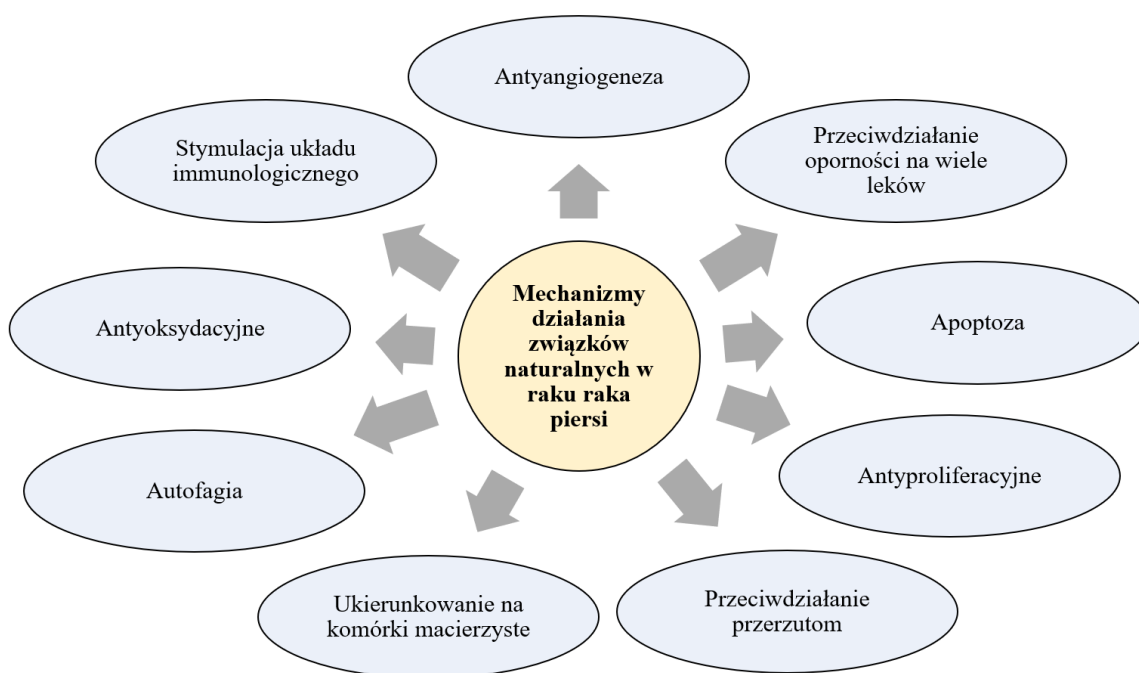
Kolejnym badanym metalem, o potencjalnym działaniu w raku piersi, była platyna. W badaniach przeprowadzonych przez Wang i wsp. [108] wykazano, przeciwnowotworowe działanie nanoplatyny. Skutkiem traktowania komórek w/w związkiem było zakłócenie przebiegu procesów ich proliferacji oraz migracji. Natomiast, co ciekawe, w badaniu przeprowadzonym przez ten sam zespół, ale z udziałem myszy stwierdzono, iż nanocząstki platyny mogą promować przerzuty raka piersi poprzez uszkodzenie bariery śródbłonkowej.

W innych badaniach wykazano, iż nanocząsteczki tlenku tytanu i złota, tak samo jak tlenku cynku czy srebra, indukowały apoptozę komórek nowotworowych. W przypadku tlenku tytanu badania zostały przeprowadzone na liniach komórkowych MDA-MB-231, Hs579T [109], a w przypadku złota na liniach komórkowych MDA-MB-231, MDA-MB468 [112]. Hendi i wsp. [113] wykazali, iż efektem suplementacji myszy nanozłotem było zahamowanie tworzenia ognisk komórek nowotworowych zarówno w gruczole piersiowym, jak i w węzłach chłonnych.

Na liniach komórkowych komórek nowotworowych typu MDA-MB-231 i MCF-7 wykazano działanie cytotoksyczne nanotlenku ceru [110, 111]. W badaniach tych w/w związek charakteryzował się o wiele silniejszym działaniem cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych, w porównaniu do normalnych linii komórkowej nie nowotworowej [111].

6. Możliwości wykorzystania związków pochodzenia roślinnego w terapii nowotworów

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem związków pochodzenia roślinnego w leczeniu raka piersi, ponieważ wykazano, że związki te są zdolne są min. do: hamowania proliferacji komórek nowotworowych, indukcji apoptozy, zapobiegania powstawaniu przerzutów, stymulacji układu immunologicznego, zmniejszania oporności na leki (Rycina 9) [114, 115]. Istnieją dowody potwierdzające ich możliwości do niwelowania działania wolnych rodników, tworzenia kompleksów z jonami metali katalizującymi powstawanie wolnych rodników, a także do hamowania aktywności niektórych enzymów uczestniczących w procesach oksydacyjnych [116]. Dzięki tym mechanizmom działania substancje pochodzenia naturalnego są zdolne do hamowania wzrostu komórek nowotworowych, nie wykazując przy tym znacznego działania toksycznego na komórki prawidłowe [117].



Rycina 9. Mechanizmy działania związków pochodzenia naturalnego w raku piersi [114-116].

Poniżej zostały przedstawione przykłady wyników badań mechanizmów działania związków pochodzenia roślinnego, które świadczą o możliwości ich wykorzystania w profilaktyce, leczeniu i/lub wspomaganie leczenia farmakologicznego w nowotworach piersi. Warto podkreślić, iż większość badań wykonana została z wykorzystaniem linii komórkowych (modelu *in vitro*).

Resweratrol jest naturalnym nieflawonoidowym polifenolem występującym głównie w skórkach winogron, borówkach, malinach, morwie i granatach. Powszechnie występuje również w czerwonych winach [118]. Resweratrol hamuje proliferację komórek nowotworowych poprzez zatrzymywanie cyklu komórkowego oraz indukuje apoptozę w kilku szlakach, np. poprzez oddziaływanie na białka p53 i Rb oraz kinazy cyklu komórkowego [119, 120]. Redukuje on ilość reaktywnych form tlenu we wnętrzu komórki, zmniejsza potencjał błony mitochondrialnej oraz hamuje fosforylację mTOR i RP-S6 oraz 4EBP1 [119]. Resweratrol, wpływając na aktywność kompleksu białkowego NF- κ B, zapobiega wzrostowi komórek guza [121]. Działanie przeciwnowotworowe wobec raka piersi zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych typu: MDA-MB-231, MDA-MB-231/PacR i komórkach raka piersi trójujemnego [119-122] oraz w badaniach *in vivo* w różnych modelach zwierzęcych. Przeprowadzone badania wykazały, iż resweratrol zmniejszał ilość oraz tempo wzrostu guzów i przerzutów u samic szczurów [121]. Ponadto jego mechanizm działania w tym badaniu był związany z ekspresją COX2, zdolnością łączenia kompleksu białkowego NF- κ B z DNA, a także ze wzrostem ekspresji 5-LOX i TGF β 1 [121]. Ponadto w komórkach raka piersi MCF-7 resweratrol zwiększa ekspresję ASPP1 i białka aktywującego p53, które stymulują apoptozę [123]. W innym badaniu z HER2-dodatnimi komórkami raka piersi wykazano, iż wpływał on na przebieg cyklu komórkowego i promował apoptozę poprzez blokowanie enzymu FASN [124]. Ponadto analogi resweratrolu w połączeniu z tamoksyfenem wykazują synergistyczny efekt w hamowaniu proliferacji komórek ER-dodatnich i ER-ujemnych raka piersi [125].

Kurkumina jest polifenolem pochodzącym z kłącza ostryżu długiego (*Curcuma longa*). Związek ten wykazuje działanie antyproliferacyjne oraz reguluje ekspresję białek, w tym cytokin i enzymów zapalnych, czynników transkrypcyjnych związanych z przeżyciem i wzrostem komórek oraz apoptozą, a także hamuje angiogenezę i nowotworzenie [126, 127]. Dostępne badania wykazały, iż w przypadku komórek raka piersi, kurkumina ma szeroki zakres działania i hamuje proces nowotworzenia, stosowana zarówno w mono jak i politerapiach z innymi związkami naturalnymi lub chemioterapeutykami. Jednym z mechanizmów działania tego związku jest zapobieganie aktywacji jądrowego czynnika kappaB, dzięki czemu dochodzi do zahamowania proliferacji ludzkich komórek rakowych, wzrostu nowotworu i przerzutów [128]. W badaniu przeprowadzonym na komórkach raka piersi MCF-7 indukowanych bisfenolem A, polifenol ten wykazywał działanie antyproliferacyjne [129]. Co więcej w badaniach udowodniono, iż, związek ten sprzyja zatrzymaniu cyklu komórkowego i hamuje

rozwój raka poprzez obniżenie ekspresji CD44 i CD24 w komórkach MCF-10F, ekspresji CD24 w komórkach MCF-7 oraz ekspresji CD44 w komórkach MDA-MB-231 [130, 131]. Ponadto przeprowadzone na myszach badania wykazały, iż związek ten w przypadku raka piersi MDA-MB-231 obniżał ekspresję genu Bcl-2 oraz stężenie białka antyapoptotycznego, a także podwyższał ekspresję genu Bax i zawartość białka proapoptotycznego [132]. Kurkumina również oddziałuje na nowotworowe komórki macierzyste, hamuje ich migrację [133].

Kwercetyna jest polifenolem wytwarzanym przez rośliny, takie jak *Allagopappus viscosissimus*, *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, *Lychnophora staavioides* oraz *Rhamnus* [134, 135]. Związek ten jest również obecny w różnych warzywach i owocach, a także w winie, herbacie i kawie [136]. Kwercetyna pobudza apoptozę wielu różnych typów komórek nowotworowych [136]. Związek ten może być wykorzystywany w profilaktyce i terapii raka piersi [134]. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* w przypadku komórek raka piersi, takich jak BT-20 i MCF-7, kwercetyna promowała apoptozę poprzez wpływ na inaktywację głównego białka antyapoptycznego c-FLIPL i wzrost regulacji receptora DR5, który nazywany jest receptorem śmierci komórkowej. Ponadto w komórkach MCF-7 kwercetyna hamowała proliferację poprzez blokowanie cyklu komórkowego [136]. Co więcej, w innych badaniach wykazano, iż związek ten hamował wzrost komórek macierzystych MDA-MB-231 oraz białek adhezyjnych komórek nabłonkowych i innych, które związane są z nadmierną proliferacją [137].

Tetrandryna jest alkaloidem występującym w pochodzącej z Azji roślinie *Stephania tetrandra* [138, 139]. Tetrandryna ma właściwości przeciwrakowe i blokuje dodatnie kanały jonowe oraz różne białka, redukując oporność na leki p/nowotworowe [139]. Ponadto wykazano, iż związek ten indukuje autofagię (komórki, które są odporne na apoptozę, ulegają autofagicznej śmierci) [140]. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych SUM-149 i SUM-159 tetrandryna wykazała właściwości antyproliferacyjne, a w przypadku komórek BMCF-7/TAM odwróciła ona oporność na tamoksyfen [139]. Alkaloid ten wykazuje istotną rolę w aktywacji śmierci komórkowej w komórkach nowotworowych, co czyni go obiecującym środkiem w zapobieganiu i leczeniu raka piersi [140].

Sylibinina jest flawonoidem pochodzącym z rośliny *Silybum marianum*, czyli ostropestu plamistego. Wykazuje właściwości antyrakowe i antyproliferacyjne. Związek ten ma działanie hamujące rozwój różnych typów nowotworów, w tym raka piersi [141, 142]. W przeprowadzonym *in vitro* badaniu na liniach komórkowych MCF-7 sylibinina indukowała

apoptozę, inicjowała autofagię i wykazywała właściwości antyproliferacyjne [141]. Fibronektyna związana jest z adhezją komórek, migracją i transformacją onkogeną, a jej ekspresja koreluje ze złym rokowaniem w różnych typach nowotworów, w tym raku piersi [143]. W badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych MDA-MB-468 i BT20 raka piersi sylibinina obniżała ekspresję genu fibronektyny w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi, a także działała antyproliferacyjnie i antymigracyjnie [143]. U myszy z wszczepionymi komórkami MDA-MB-231 raka piersi, związek ten wykazywał działanie przeciwnowotworowe, które polegało na hamowaniu fosforylacji EGFR, obniżaniu ekspresji genów COX-2, VEGF i MMP-9, hamowaniu migracji komórek oraz zmniejszaniu rozmiaru guza [144]. Natomiast w komórkach MCF-7 sylibinina oddziałując na szlak MEK/ERK hamowała migrację komórek i ekspresję genu MMP-9, która odgrywa ważną rolę w przerzutach nowotworowych, migracji i inwazji komórek [145].

Tymochinon występuje w nasionach rośliny *Nigella sativa*. Związek ten wykazuje aktywność wobec różnych typów nowotworów, w tym raka piersi [146-150]. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym na mysim modelu udowodniono, iż p/nowotworowy mechanizm tego związku jest związany z wpływem na białka p53, p73, STAT3, NF- κ B, PPAR- γ oraz reaktywne formy tlenu [148]. Ponadto jego działanie antymigracyjne, proapoptotyczne i antyproliferacyjne zostało potwierdzone w badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych raka piersi MCF-7 [149]. Co więcej w przeprowadzonych badaniach na komórkach raka piersi MCF-7 opornego na doksorubicynę wykazano, iż związek ten blokował cykl komórkowy w fazie G2/M i indukował apoptozę znosząc przy tym oporność na chemioterapię [150].

Honokiol jest naturalnym związkiem pozyskiwanym z rośliny *Magnolia grandiflora* [151]. Związek ten powoduje zahamowanie procesu angiogenezy oraz zahamowanie wzrostu śródbłonna naczyniowego [151-153]. W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* na liniach komórkowych MCF-7 i BT-474 oraz *in vivo* przeprowadzonych z udziałem myszy indukowanych komórkami MDA-MB-231 związek ten spowodował zatrzymanie cyklu komórkowego, a tym samym proliferacji komórek nowotworowych oraz indukował apoptozę [154]. Ponadto honokiol wpływa na szereg szlaków metabolicznych związanych z kancerogenezą. Otyłość w znacznym stopniu wpływa na ryzyko, progresję i złe rokowanie w raku piersi, a molekularne efekty otyłości są w znacznym stopniu mediowane przez leptynę. W badaniu przeprowadzonym na myszach honokiol hamował indukowaną leptyną sygnalizację Wnt1-MTA1- β -kateniny i fosforylację STAT3 [155]. Ponadto związek ten hamował wzrost

ludzkich komórek MDA-MB-231 raka piersi poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz hamowanie czynników, które przyczyniają się do wzrostu komórek raka piersi i angiogenezy [156].

Diosgenina jest saponiną steroidową pozyskiwaną z roślin *Dioscorea villosa* i *Trigonella foenum graecum* [157]. Wykazuje właściwości przeciwhipercholesterolemiczne, przeciwhiperglukemiczne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe i przeciwcukrzycowe [158, 159]. Ponadto związek ten hamuje wzrost i progresję różnych typów komórek nowotworowych, a także sprzyja apoptozie [158-162]. Przeciwnowotworowy mechanizm działania tego związku jest związany z regulacją różnych procesów sygnalizacji komórkowej, proliferacją, różnicowaniem i apoptozą. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym na liniach komórkowych MDA-MB-231, diosgenina hamowała migrację i inwazję komórek nowotworowych oraz progresję nowotworów [158]. Ponadto w badaniach na komórkach MDA-MB-231, MDA-MB-453 i T47D związek ten obniżał ekspresję białek antyapoptotycznych, Bcl-2 i cIAP-1 [159]. W przypadku ER-dodatnich komórek MCF-7 raka piersi, pod wpływem diosgeniny dochodziło do zahamowania ich wzrostu i stymulowania procesu apoptozy [160]. W badaniu *in vivo*, przeprowadzonym z udziałem szczurów szczepu *Sprague Dawley* z rakiem sutka, związek ten hamował aktywację białka p38 i ERK1/2 [161]. W modelach z komórkami ER+ i ER- diosgenina hamowała szlak Akt i kinazy Akt, które odgrywają istotną rolę w lekooporności i agresywności nowotworowej. Ponadto stwierdzono również, że diosgenina, poprzez obniżenie ekspresji genów cykliny D1, cdk-2 i cdk-4, powoduje zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1, co może powodować zahamowanie proliferacji komórek ER+, jak i ER- i indukcję apoptozy [162].

Garcinol jest naturalnym roślinnym polifenolem występującym w roślinach z rodzaju *Garcinia* [163]. Związek ten wykazuje właściwości przeciwnowotworowe wpływając między innymi na szlak sygnałowy NF- κ B, dzięki czemu następuje zahamowanie wzrostu komórek i indukcja apoptozy [164, 165]. W wykonanych *in vitro* badaniach, na komórkach MCF-7, traktowanych estradiolem, wykazano, iż pod wpływem garcinolu proliferacja indukowana przez estradiol została zahamowana, cykl komórkowy został zatrzymany w fazie G0/G1 i wzrósł wskaźnik apoptozy komórek [165]. Garcinol powoduje zahamowanie szlaku sygnałowego Wnt, który odgrywa zasadniczą rolę w procesie kancerogenezy [164]. Związek ten ogranicza oddziaływanie czynników powodujących wzrost guzów piersi [166].

Likopen należy do terpenoidów. Występuje w pomidorach, marchwi, arbużach, papai i wiśniach. Jako silny antyoksydant, reguluje aktywność wielu genów zaangażowanych w następujące mechanizmy: naprawę DNA, kontrolę cyklu komórkowego i proces apoptozy [167, 168]. Likopen może indukować apoptozę komórek i odgrywa istotną rolę w regulacji szlaków sygnałowych prowadzących do zatrzymania cyklu komórkowego. Wykazano, że likopen, poprzez blokowanie fosforylacji Akt, hamuje proliferację komórek potrójnie ujemnego raka piersi [169]. W badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych MCF-7 antyproliferacyjne działanie likopenu związane było z regulacją ekspresji genów p53 i Bax, co w konsekwencji spowodowało obniżenie ich proliferacji i pobudziło apoptozę [170].

Galusan epigallokatechiny jest katechiną obecną w zielonej herbacie [171]. W przeprowadzonych *in vitro* badaniach stwierdzono, że galusan wykazuje działanie przeciwnowotworowe poprzez mechanizmy epigenetyczne, powodując min. demetylację lub tłumienie metylacji promotorów genów supresorowych [172, 173]. W badaniach na linii komórkowej raka piersi MCF-7 galusan epigallokatechiny hamował, indukowaną działaniem estrogeny, proliferację komórek nowotworowych [174, 175]. W innych badaniach wykazano, iż poprzez wpływ na ekspresję cyklooksygenazy 2, katechiny ta może odgrywać istotną rolę w procesie powstawania kwasu arachidonowego [176, 177]. W badaniach klinicznych nad rakiem piersi wykazano, że związek ten zwiększał wrażliwość guzów na promieniowanie jonizujące, a także chronił organizm przed toksycznymi skutkami ubocznymi chemioterapii i radioterapii [178, 179]. W niektórych publikacjach zawarte są jednak dane o występowaniu niepożądanych interakcji galusanu z niektórymi lekami przeciwnowotworowymi, w związku z tym istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań w tym kierunku [115].

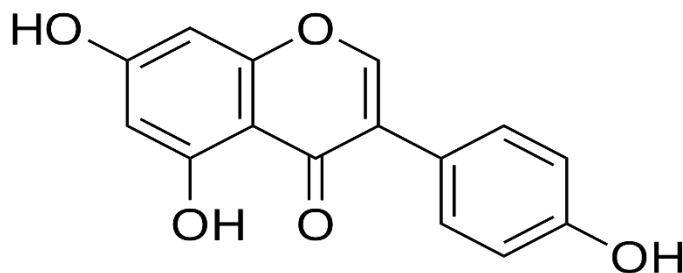
Sulforafan jest izotiocyjanianem występującym w brokułach, kapuście, kiełkach brokułów i jarmużu [180]. Wykazano, że hamuje on proliferację, angiogenezę i przerzuty [180-185]. Jednocześnie może on indukować zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę w komórkach raka piersi. Przeprowadzone badania wykazały, że w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 sulforafan, poprzez wpływ na metylację DNA i modyfikacje histonów, powodował, w sposób zależny od dawki i czasu, zahamowanie hTERT (ludzkiej odwrotnej transkryptazy telomerazy) [114]. Ponadto związek ten wykazuje działanie chemoprewencyjne poprzez hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M komórek ludzkiego raka piersi [181]. Sulforafan, poprzez oddziaływanie na mechanizmy epigenetyczne, powoduje zmianę aktywacji receptora (ER α) [182-184]. Wykazano, że sulforafan zwiększał wrażliwość komórek ER α na tamoksifen, a istotną rolę w tym procesie odgrywały mechanizmy epigenetyczne [183].

Genisteina - ze względu na przedmiot prowadzonych badań charakterystyka związku zostanie przedstawiona w następnym rozdziale.

7. Genisteina

7.1. Struktura chemiczna, występowanie genisteiny

Genisteina (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej: 5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenilo)chromen-4-on) zaliczana jest do grupy izoflawonów (Rycina 10). Po raz pierwszy została wyizolowana z rośliny *Dyera Genista tinctoria L.* od której pochodzi jej nazwa [185, 186].



Rycina 10. Wzór strukturalny genisteiny [186].

Genisteina występuje w roślinach strączkowych, a także w nasionach, owocach i warzywach, takich jak kielki lucerny i koniczyny, brokuły, kalafior, słonecznik, jęczmień, mączka jęczmienna, kminek i nasiona koniczyny. Natomiast głównym źródłem genisteiny w diecie jest soja owłosiona (*Glycine max*, *Soja hispida L.*) i produkty sojowe [185, 187]. Jest to jednoroczna roślina zielna z rodziny bobowatych, pochodząca ze wschodniej Azji, gdzie uprawiana w wielu krajach, głównie w Chinach, Japonii i Indiach. Zawartość genisteiny w poszczególnych produktach sojowych przedstawiona została w Tabeli 5.

W krajach Azji, gdzie odnotowuje się największe spożycie soi, codzienne pobranie genisteiny wynosi 30 - 50 mg, a jej poziom w osoczu krwi może osiągać wartości rzędu 0,1 - 10 nM. Natomiast w populacji europejskiej i północnoamerykańskiej, ze względu na odmienne nawyki żywieniowe i niższą zawartość fitoestrogenów w diecie, jej stężenie w osoczu wynosi około 70 nM [187].

Tabela 5. Zawartość genisteiny w poszczególnych produktach sojowych [188].

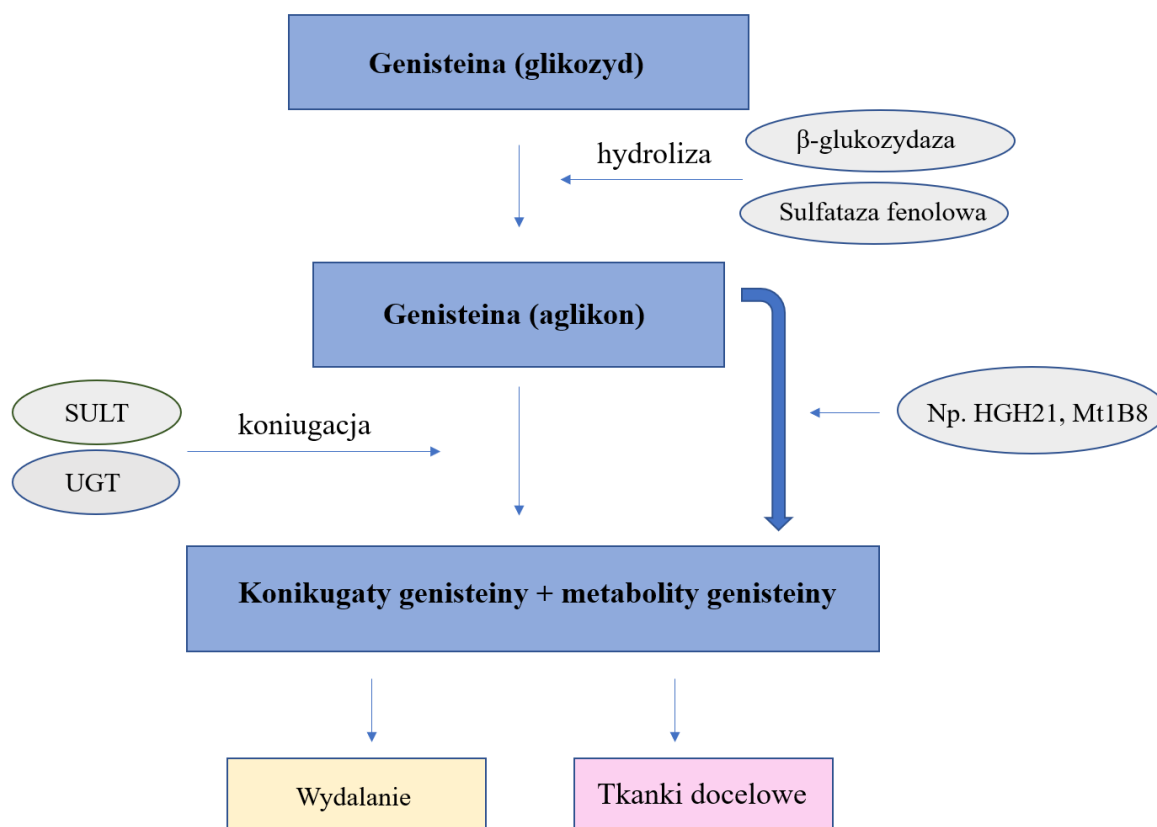
Źródło genisteiny	Zawartość w żywności (mg/100 g)
Mąka sojowa pełnotłusta	98,77
Mąka sojowa odtłuszczona	87,31
Nasiona soi dojrzałe, świeże	80,99
Nasiona soi dojrzałe, suche, prażone (w tym orzechy sojowe)	75,78
Natto	37,66
Chipsy sojowe	27,45
Nasiona soi dojrzałe, w puszkach	25,15
Miso	23,24
Błonnik sojowy	21,68
Tofu smażone	18,43
Pasta sojowa	17,79
Jogurt sojowy	16,59
Tofu świeże	12,99
Lecytyna sojowa	10,30
Jogurt tofu	9,40
Napój sojowy	5,10
Makaron sojowy	3,70

mg: miligramy; g: gramy

Genisteina jest związkiem lipofilnym (Log P=3,04), ma niską masę cząsteczkową (Mw= 270) i wykazuje niską rozpuszczalność w wodzie (5,3 μ M) [189, 190].

7.2. Metabolizm genisteiny

Genisteina występuje w produktach spożywczych głównie w formie glikozydowej (7-O- β -D-glukopiranozylogenisteiny, znanej pod nazwą genistyny, oraz jej estrów) [191]. W miarę przechowywania i przetwarzania produktów spożywczych wzrasta zawartość aglikonu - genisteiny. W jelicie cienkim pod wpływem działania bakteryjnych β -glukozydaz oraz sulfatazy fenolowej następuje hydroliza glikozydu i powstaje aktywny aglikon - genisteina [188]. Następnie, genisteina może być bezpośrednio absorbowana w postaci niezmienionej lub przekształcana dalej przez florę jelitową. Stwierdzono, że metabolizm genisteiny zależy od rodzaju flory bakteryjnej, jednakże proces ten jest jeszcze nie do końca poznany [189, 192, 193]. Przeprowadzono doświadczenie, w którym siedemnaścioro dzieci w wieku od 4 do 17 lat podzielono na dwie grupy [193]. Obie grupy otrzymywały odpowiednią, taką samą, porcję produktów sojowych. Grupa pierwsza otrzymywała dodatkowo doustny antybiotyk. Wykazano, że dzieci, które otrzymywały dodatkowo doustny antybiotyk charakteryzowały się niższym stężeniem genisteiny w moczu (wydalały: $6,4 \pm 1,0$ nmol/h/kg), w odniesieniu do grupy, które nie otrzymywały antybiotyku (wydalały: $10,1 \pm 1,6$ nmol/h/kg). Wykazano, że za przekształcenie genisteiny w formę aglikonu odpowiedzialne są bakterie *Escherichia coli* HGH21 oraz Gram dodatnie bakterie HGH6. Dodatkowo Gram dodatnie bakterie HGH6 mogą przekształcać genisteinę do dihydrogenisteiny. Dihydrogenisteina, przy udziale bakterii HGH6 oraz Mt1B8 konwertowana jest do jej aktywnego metabolitu 5-hydroksy-ekwolu [8]. W wątrobie, przy udziale enzymów: UDP-glukuronozylotransferazy (UGTs) i sulfotransferazy (SULTs) zachodzi sprzężanie genisteiny i jej metabolitów z kwasem glukuronowym lub/i kwasem siarkowym. Jednakże koniugaty genisteiny mogą być w tkankach przekształcane przez β -glukuronidazę ponownie do aglikonu. Genisteina jest wydalana z moczem jako monoglukuronid na poziomie około 53-76% oraz w znacznie mniejszym stopniu jako diglukuronid (12-16%) i sulfoglukuronid (2-15%). Jedyne 1-2% genisteiny wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej [8]. Na rycinie 11 przedstawiony został schemat metabolizmu genisteiny u ludzi [8].



Rycina 11. Metabolizm genisteiny [8].

SULT: sulfotransferaza; UGT: glukuronilotransferazy

7.3. Aktywność biologiczna genisteiny

Genisteina wykazuje szereg aktywności biologicznych. Korzystne działanie tego izoflawonu udowodniono w wielu badaniach. Genisteina może odgrywać korzystną rolę w łagodzeniu objawów menopauzy, może powodować zmniejszenie częstości występowania osteoporozy, chorób układu sercowo-naczyniowego, otyłości, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych, czy chorób pasożytniczych [185].

Menopauzie towarzyszą zaburzenia, takie jak wzrost ciśnienia krwi, zmiana profilu lipidowego w ustroju, utrata masy tkanki kostnej, zaburzenia pamięci, utrata libido, bezsenność, depresja, czy uderzenia gorąca. Objawy te obniżają komfort życia kobiet [187]. Uderzenia gorąca są najczęściej występującą dolegliwością okresu około menopauzalnego. Występują u 70-85% kobiet w Europie i Ameryce, natomiast wśród Azjatek mniej niż 20% uskarża się na te objawy [194]. Stwierdzono, że fitoestrogeny mogą stanowić skuteczną terapię w zmniejszaniu uderzeń gorąca [187]. Badania prospektywne Nagata i wsp. [195] potwierdziły ujemną korelację pomiędzy spożyciem produktów sojowych, a występowaniem uderzeń gorąca w

populacji Japonek w okresie pomenopauzalnym. Murkies i wsp. [196] wykazali 40% obniżenie częstości występowania uderzeń gorąca u kobiet w okresie menopauzy, spożywających przez 12 tygodni po 45 g mąki sojowej dziennie. W badaniach z udziałem 555 kobiet potwierdzono skuteczność działania standaryzowanego ekstraktu izoflawonów sojowych (52-104 mg/dobę) w obniżaniu częstotliwości występowania dolegliwości takich jak uderzenia gorąca i nadmierna potliwość [187].

Jedną z głównych chorób związanych z niskim stężeniem 17- β -estradiolu w osoczu jest osteoporoza. Osteoporoza charakteryzuje się ubytkiem masy kostnej i dezorganizacją struktury kości, a częstość jej występowania wzrasta z powodu starzenia się społeczeństwa [187]. Spowodowana jest głównie obniżeniem dostępności wapnia i zwiększoną jego resorpcją z kości. Niedobór 17- β -estradiolu pobudza działanie osteoklastów i hamuje aktywność osteoblastów [197]. Obecnie wiadomo, że izoflawony wpływają na gospodarkę wapnia i mają istotne znaczenie w przeciwdziałaniu osteoporozie [187]. Kobiety po menopauzie populacji japońskiej i chińskiej wykazują większą mineralną gęstość kości (bone mineral density - BMD) niż kobiety populacji zachodniej. Podawanie przez 6 mies. genisteiny w dawce 90 mg na dzień kobietom po menopauzie spowodowało zwiększenie się gęstości kości i zmniejszyło stężenie biochemicznych markerów resorpcji kości [197].

Istnieje wiele doniesień na temat pozytywnego wpływu izoflawonów na układ sercowo-naczyniowy [197]. Dieta bogata w soję powoduje obniżenie stężenia triglicerydów i cholesterolu frakcji LDL w osoczu. Metaanaliza 38 badań wykazała, że spożywanie 47 g białka sojowego dziennie powoduje obniżenie stężenia całkowitego cholesterolu o 9%, cholesterolu frakcji LDL o 13%, triglicerydów o 11% [198]. Badania wykazały, że genisteina powoduje znaczący wzrost aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu i zwiększenie syntezy tlenu azotu, czynnika o działaniu wazorelaksacyjnym i przeciwplateletowym [187].

Spożywanie izoflawonów może wpływać korzystnie na przebieg cukrzycy typu II u kobiet w okresie pomenopauzalnym. Wykazano m.in., że przyjmowanie dużej dawki izolowanej genisteiny (54 mg/dzień) powoduje zwiększenie tolerancji glukozy i obniżenie insulinooporności u kobiet po menopauzie [199, 200].

Stwierdzono korzystny wpływ fitoestrogenów na funkcje poznawcze u kobiet po menopauzie [195]. Stosowanie preparatów izoflawonów poprawia sprawność pracy mózgu kobiet po menopauzie. Duffy i wsp. [201] w badaniu kontrolowanym placebo wykazali

poprawę pamięci, koncentracji i zdolności do planowania u kobiet po menopauzie, przyjmujących izoflawony z soi.

Związek ten jest szeroko badany pod kątem możliwości zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [202]. Leczenie chorób neurodegeneracyjnych, schorzeń charakteryzujących się postępującą utratą komórek nerwowych, stanowi ogromne wyzwanie współczesnej medycyny. Występowanie agregatów białkowych stanowi przyczynę aż 70% tych schorzeń. Wykazano skuteczność działania genisteiny w usuwaniu agregatów białkowych tworzonych przez β -amyloid i hiperfosforylowaną formę białka tau, a także zmutowaną huntingtynę. W związku z powyższym duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem genisteiny w terapii choroby Alzheimera, Huntingtona czy innych chorób spowodowanych agregacją białek [202].

Genisteina znalazła również zastosowanie w leczeniu chorób skóry. U pacjentów z łuszczycą o nasileniu umiarkowanym do ciężkiego zapobiegała progresji choroby [203].

Związek ten wykazuje również silne właściwości przeciwpasożytnicze. Wyciąg z korzenia bulwiastego rośliny strączkowej *Flemingia vestita* był tradycyjnym środkiem stosowanym przeciwko robakom już wśród plemion Khasi w Indiach i to właśnie opisywany izoflawon w największej mierze odpowiedzialny był za tę aktywność [204].

7.4. Genisteina, a rak piersi

Właściwości genisteiny, które uzasadniają możliwości zastosowania jej w chemoprewencji nowotworów, to m.in. właściwości przeciwutleniające, hamujące angiogenezę, aktywność antyproliferacyjna, działanie proapoptotyczne, zdolność do indukcji różnicowania, wpływ na cykl komórkowy i uczestniczące w nim cząsteczki o działaniu regulatorowym [186, 188]. Przykłady badań aktywności biologicznej genisteiny *in vitro* przedstawiono w Tabeli 6.

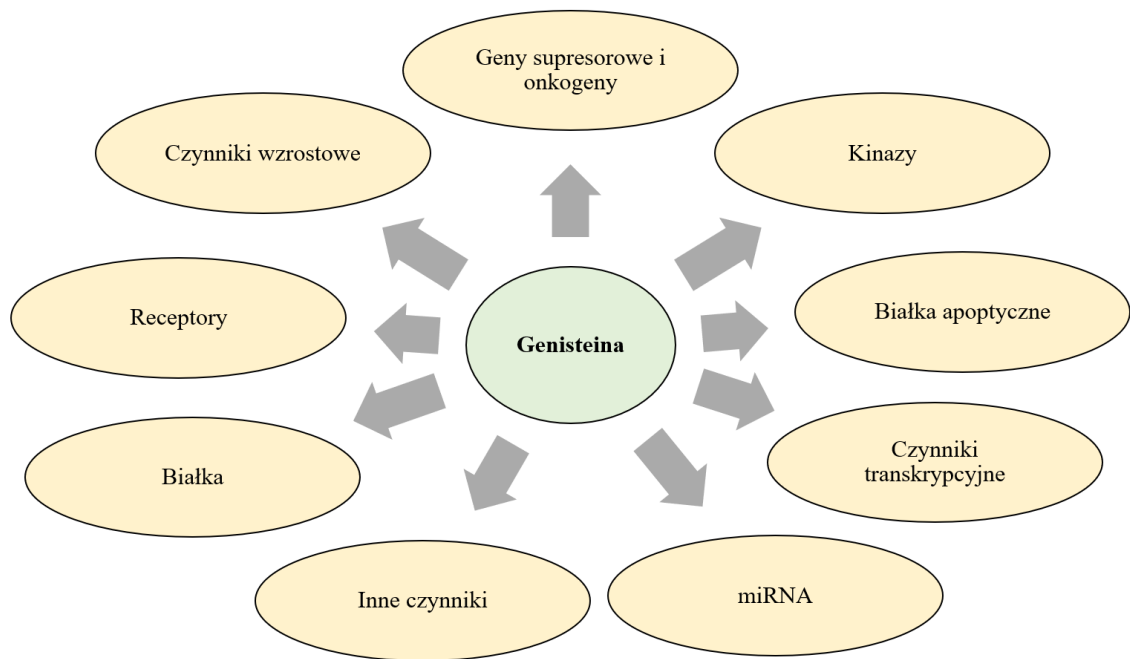
Tabela 6. Przykłady badań aktywności biologicznej genisteiny *in vitro*.

Model	dawka	Wpływ na biomarkery	rezultaty	Referencje
MCF-7	50-100 μ M	Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, \uparrow aktywności białka szoku termicznego	\downarrow podziału komórek, \downarrow progresji raka	205

MCF-7	50-200 μM	\downarrow CDKs, \uparrow poziomu I κ B- α , \downarrow SRF, RAG-1, DOC2	\downarrow inwazji komórek, \downarrow progresji raka, \uparrow apoptozy	206
	50 μM	\uparrow aktywności Ca $^{2+}$ - zależnych proapoptycznych białek, \uparrow aktywności kaspazy 12	\downarrow wzrostu guza, \uparrow apoptozy	207
	5-100 μM	\downarrow zahamowanie aktywności szlaku IGF- 1R-PI3 K/Akt, \downarrow poziomu Bcl-2/Bax	\uparrow apoptozy \downarrow prolifracji komórek	208
	50-200 μM	\downarrow Bcl-2 \uparrow Bax \downarrow Cyklina D1 \downarrow stosunku Bcl-2/Bax	\downarrow wzrostu komórek, \uparrow apoptozy	209
	0,01-100 μM	\uparrow stosunku Bax/Bcl-2	\uparrow apoptozy	210
	5-20 μM	Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, \downarrow NF- κ B, \downarrow cykliny B1	\uparrow apoptozy, zahamowanie cyklu komórkowego	211
	2,5-400 μM	\uparrow p21WAF1 (p21), p16INK4a (p16) \downarrow BMI1, c-MYC	\downarrow wzrost komórek	212
MDA-MB-231	0,5-15 μM	Zahamowanie fosforylacji koneksyny	Indukcja apoptozy, zahamowanie cyklu komórkowego	213
	5-20 μM	Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, \downarrow c-Jun, c-Fos, \downarrow CDK1	Zahamowanie różnicowania komórek	214
	20-80 μM	Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M	Zahamowanie wzrostu komórek, zahamowanie tworzenia guzów	215
	500 nm	Remodeling cytoszkietu, zahamowanie cyklu komórkowego	Zahamowanie wzrostu komórek, \uparrow apoptozy	216
T-47D	1-100 μM	\downarrow ERK1/2, p90RSK	\downarrow proliferacji komórek	217

HCC1395	1-200 μ M	\uparrow TFTI-2, ATF3, DNMT1, MTCBP-1, zahamowanie cyklu komórowego w fazie G2/M, \downarrow MMP-2, \downarrow MMP-7, CXCI12	Zahamowanie wzrostu komórek	219
SUM1315MO2	1-100 μ M	\uparrow Bax \downarrow Bcl2 \downarrow aktywności cykliny D1	Zahamowanie proliferacji	219
HCC38	4-10 ppm	Redukcja metylacji wysp CpG, wzrost poziomu białka BRCA1	Zahamowanie wzrostu komórek	220
Hs578t	1-50 μ M	\downarrow aktywności mir-155, \uparrow ekspresji FOXO3a, p27, PTEN	Zahamowanie żywotności komórek, indukcja apoptozy	221
DD-762, Sm-MTC	7-274 μ M	Zaburzenie aktywności kaspazy 3	Zahamowanie proliferacji komórek	222
BT474	50 μ M	\downarrow kinazy tyrozynowej, \downarrow aktywacji HER2, \downarrow ścieżki MAPK	Zahamowanie podziału komórek	223
MCF-10A, MCF-ANeoT, MCF-T63B	1-10 μ g/ml	Obniżenie ekspresji rybosomalnej kinazy 6 i kinazy tyrozynowej	Zahamowanie angiogenezy	224

Wykazano, że mechanizm działania genisteiny jest złożony i wielokierunkowy. Na rycinie 12 przedstawione zostały główne cele molekularne oddziaływania genisteiny w raku piersi [225].



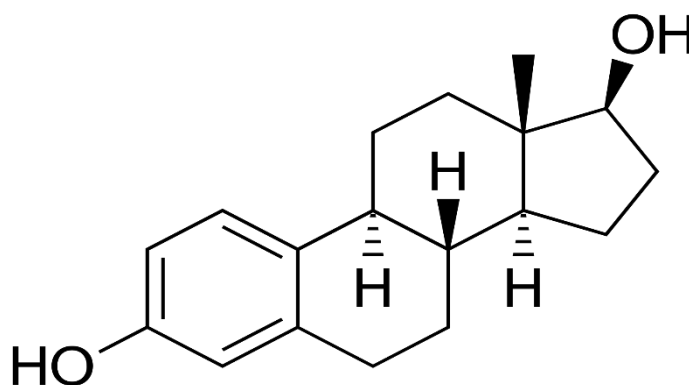
Rycina 12. Cele molekularne działania genisteiny w raku piersi [225]

Pomimo bardzo obiecujących danych dotyczących zastosowania genisteiny w warunkach *in vitro*, wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* budzą duży niepokój. Z jednej strony wyniki badań epidemiologicznych wskazują, iż spożywanie nasion soi może przyczyniać się do rzadszego występowania raków piersi, okrężnicy, gruczołu krokowego, tarczycy oraz raków głowy i szyi [186]. Z drugiej jednak strony część doniesień wskazuje, że genisteina może stymulować proliferację komórek szczególnie w przypadku nowotworów hormonozależnych lub zmniejszać ich wrażliwość na stosowane obecne leki przeciwnowotworowe [8]. W związku z powyższym aktywność biologiczna genisteiny jest wciąż przedmiotem intensywnych badań.

Badania epidemiologiczne w krajach azjatyckich (Singapur, Japonia i Chiny) i w społeczności Azjatek mieszkających w Ameryce wykazały odwrotną korelację pomiędzy spożyciem izoflawonów, a ryzykiem zachorowania na raka gruczołu sutkowego u kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym [194]. Kang i wsp. [226] przeprowadzili badania oceny wpływu spożywania produktów sojowych na przebieg choroby u pacjentek z rakiem piersi. W badaniu wzięło udział 524 kobiet chorych na nowotwór piersi (248 w okresie przedmenopauzą (47%) i 276 w okresie po menopauzie (53%). Średnia zawartość izoflawonów w dietach badanych pacjentek wynosiła 25.6 mg/dzień. Badacze wykazali, że dieta bogata w izoflawony nie miała wpływu na wskaźnik śmiertelności kobiet w okresie przedmenopauzą (31%),

natomiast w przypadku pacjentek po menopauzie odsetek nawrotów choroby był statystycznie istotnie niższy. Podobne wyniki badań uzyskali Cho i wsp. [227]. Stwierdzili, że wysokie spożycie produktów sojowych (76 g izoflawonów/dzień) powoduje obniżenie ryzyka zachorowania na raka piersi w przypadku kobiet w okresie po menopauzie ($p=0,046$). Podobnej korelacji nie zaobserwowali w przypadku kobiet w okresie przedmenopauzą. Interesujące wyniki badań otrzymali McMichael-Phillips i wsp. [228]. Przeprowadzili badania z udziałem 48 kobiet, w okresie przedmenopauzą, chorych na nowotwór piersi w stopniu łagodnym i złośliwym. Kobiety zostały podzielone na dwie grupy. 14 dni przed zabiegiem wycięcia guzów pierwsza grupa kobiet otrzymała dietę wzbogaconą w 60 g soi (45 mg izoflawonów), natomiast druga grupa otrzymała taką samą dietę ale pozbawioną suplementacji. Wykazali, że krótkotrwała suplementacja diet kobiet soją stymulowała proliferację komórek raka piersi. Inne doniesienia również potwierdzają, że genisteina może stymulować rozwój i progresję raka piersi. W badaniu przeprowadzonym przez Shike i wsp. [229], z udziałem 140 kobiet, wykazano, że suplementacja produktami sojowymi stymuluje ekspresję (powyżej 2-krotną) genów, biorących udział w procesie proliferacji komórek, tj. FGFR2, E2F5, BUB1, CCNB2, MYBL2, CDK1, and CDC20 ($P < .01$). Ju i wsp. [230] stwierdzili, że genisteina może również stymulować wzrost guzów hormonozależnych u osób z niskim poziomem 17β -estradiolu. Wykazali, że wzrost guzów u myszy z wszczepionymi komórkami MCF-7 suplementowanych genisteiną był zależny od poziomu 17β -estradiolu.

Jedną z najbardziej znanych właściwości genisteiny jest jej aktywność estrogena. Fitoestrogeny mają podobną chemiczną strukturę do 17β -estradiolu (Rycina 13).



Rycina 13. Wzór strukturalny 17β -estradiolu [231].

Ze względu na podobieństwo strukturalne do 17- β -estradiolu, izoflawony mają zdolność do wiązania się z receptorem estrogenowym, zarówno z jego formą α (ER- α), jak i formą β (ER- β) [232]. Interakcja izoflawonu z receptorem estrogenowym prowadzi do jego aktywacji i tzw. estrogenowej odpowiedzi. Powinowactwo genisteiny do ER- β jest 20-30-krotnie wyższe niż do ER- α i jest porównywalne z powinowactwem 17- β -estradiolu. Z powodu strukturalnego podobieństwa fitoestrogenów do estrogenów fizjologicznych można założyć, że mogą one promować kancerogenezę i zwiększać ryzyko zachorowania na raka sutka. Estrogeny mogą wywoływać efekt karcinogeny przez mechanizmy zależne od receptorów estrogenowych, ale także przez genotoksyczne produkty metabolizmu estrogenów [194]. Działanie genisteiny w kontekście terapii chorób nowotworowych zależy prawdopodobnie od zastosowania konkretnej dawki, stanu fizjologicznego badanego organizmu oraz diety.

Biorąc pod uwagę wyniki dotychczas przeprowadzonych badań w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz niejednoznaczne wyniki dotyczące wpływu genisteiny na rozwój i przebieg nowotworu piersi uzasadnione zdaje się być przeprowadzenie dotykowych badań w szczególności *in vivo* w celu wyjaśnienia działania genisteiny i jej formy w postaci nano, która może wykazywać inne właściwości fizyko-chemiczne.

8. Biomarkery

Biomarkerami mogą być geny, białka, substancje chemiczne, kwasy nukleinowe, lipidy i inne metabolity oraz całe komórki np. guza, które wskazują na obecność stanu chorobowego lub zaburzeń fizjologicznych [233, 234]. Biomarkery odgrywają istotną rolę w wykrywaniu raka piersi i ustaleniu postępowania terapeutycznego, mogą być wykrywane we krwi, moczu bądź w wycinkach tkanek pacjenta [235]. Markery nowotworowe w zależności od pochodzenia możemy podzielić na dwa typy. Pierwsze z nich są produkowane przez same komórki nowotworowe (tumor specific antigens), a drugie są produkowane przez prawidłowe komórki w wyniku odpowiedzi na proces kancerogenezy (tumor associated antigens) [236]. Do najważniejszych biomarkerów, które determinują predyspozycje do wystąpienia raka piersi, należą geny supresorowe BRCA1 i BRCA2. Mutacje w obrębie genów BRCA związane są ze wzrostem ryzyka zachorowania nawet do 70% w porównaniu do populacji bez mutacji [237]. W nowotworach piersi obserwuje się również mutacje w obrębie innych genów supresorowych takich jak: p53, RB, NM23, p16 (INK4A), PTEN [238]. Kancerogeneza może być indukowana również mutacjami zachodzącymi w obrębie onkogenów. W nowotworach piersi istnieje kilka

onkogenów i związanych z nimi białek, które traktowane są jako markery. Do tej grupy biomarkerów zaliczamy geny z grupy BCL2, które odpowiadają za zaburzenia procesu apoptozy [239]. W raku piersi jednym z najistotniejszych wskaźników jest ocena poziomu aktywności receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR). Badanie aktywności w/w receptorów ma zarówno charakter prognostyczny, ze względu na fakt, że koreluje z niskim wskaźnikiem proliferacji komórek i wyższym poziomem zróżnicowania komórek, jak i predykcyjny - ponieważ guzy wykazujące zarówno ER+, jak i PR+ wykazują większą wrażliwość na terapię hormonalną [238]. Do istotnych czynników prognostycznych w raku piersi należy status receptora HER2, który jest glikoproteiną pełniącą funkcję receptora błonowego, należąca do rodziny receptorów dla naskórkowych czynników wzrostu. Warto podkreślić, że podwyższone stężenie protoonkogenu HER2 (neu, C-erbB2) w surowicy krwi jest związane z niekorzystnym rokowaniem zarówno we wczesnym, jak i zaawansowanym raku piersi [240]. Ponadto do biomarkerów, które są zaliczane do czynników wzrostu należą również: TGF- α , IGF1, VEGF, PDGF i FGF. Podczas procesu kancerogenezy dochodzi do intensywnej proliferacji. Białkiem umożliwiającym ocenę tempa proliferacji w tkance nowotworowej jest białko Ki-67. Pacjentki, u których w ponad połowie komórek guza stwierdzono ekspresję tego czynnika, są w grupie wysokiego ryzyka nawrotu choroby. Dodatkowo wysoka ekspresja tego czynnika związana jest z gorszymi rokowaniami, ale z lepszą odpowiedzią na chemioterapię [241]. W tabeli 7. przedstawiono wykaz markerów prognostycznych i predykcyjnych stosowanych w raku piersi [238].

Tabela 7. Markery prognostyczne i predykcyjne w raku piersi [238].

Markery prognostyczne	Markery predykcyjne
Indeks wzmożonej proliferacji <ul style="list-style-type: none"> • Ki67 • PCNA • MIB1 	Aktywność receptorów estrogenowych
Markery nadmiernej ekspresji onkogenów <ul style="list-style-type: none"> • CerB2 • Czynn timerformacji wzrostu (TGF-α) • Receptor czynn timerformacji wzrostu naskórka (EGFR) 	Aktywność receptorów progesteronowych

<p>Wskaźnik zaburzeń apoptozy</p> <ul style="list-style-type: none"> • Podwyższona ekspresja BCL2 • Podwyższony współczynnik BAX/BCL2 	Aktywność receptora HER 2/neu
<p>Marker zaburzeń sygnalizacji komórkowej</p> <ul style="list-style-type: none"> • Akumulacja białka jądrowego p53 • Aberracja w przekazie informacji w procesie różnicowania 	
<p>Nadekspresja C-Myc i związanych z nim białek</p>	
<p>Brak receptorów dla markerów różnicowania</p> <ul style="list-style-type: none"> • Czynnika transformującego wzrost TGF-β II kwasu retynowego 	
<p>Zaburzenia białek angiogenezy</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nadmierna aktywność czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) 	

Kolejnym dobrze poznanym biomarkerem prognostycznym jest ocena zawartości CA 15-3 w surowicy. W wielu badaniach wykazano, że podwyższone stężenie CA 15-3 w surowicy wiąże się z niekorzystnym wynikiem leczenia. Prawdopodobnym powodem, dla którego wysokie przedoperacyjne stężenie CA 15-3 u chorych na raka piersi prognozuje złe rokowanie, jest fakt, że biomarker ten wskazuje na występowanie mikroprzerzutów, przerzutów utajonych, które nie są widoczne klinicznie lub radiologicznie [242]. W przypadku raka piersi istotne jest również ocenianie podtypu molekularnego nowotworu na podstawie ekspresji genów, które zostały opisane w rozdziale 3 (Nowotwory piersi).

Dotychczas badane biomarkery raka piersi rzadko znajdują zastosowania w badaniach przesiewowych. Ich podstawowym ograniczeniem jest zbyt niskie stężenie w płynach biologicznych u pacjentów, w przypadku raka niezaawansowanego oraz niska czułość i specyficzność we wczesnych stadiach choroby [243]. Markery te zazwyczaj są wykrywane w późniejszych stadiach rozwoju choroby nowotworowej i służą do monitorowania choroby podczas leczenia, jak również po jego zakończeniu [244]. Z tego też powodu trwają poszukiwania mające na celu identyfikację markerów, które będą wykrywały chorobę na wczesnym etapie kancerogenezy [241].

Wśród nowych biomarkerów, który mogą mieć zastosowanie w diagnostyce nowotworów piersi, są metaloproteinazy, które uczestniczą w procesach tworzenia przerzutów

oraz angiogenezie. Do metaloproteinaz o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym należy MMP-9 [245].

Kolejną grupą obiecujących biomarkerów są chemokiny i receptory błonowe. Wykazano, iż u pacjentów z rakiem piersi z przerzutami do płuc oraz kości występuje nadekspresja chemokiny CCL2, wydzielanych przez monocyty oraz makrofagi [246, 247].

Coraz więcej badań naukowych dotyczy analizy metylowych pochodnych DNA i ekspresji genów, ponieważ dają one duże szanse na wykrycie nowotworów na wczesnym etapie kancerogenezy. Cząsteczki DNA w komórkach nowotworowych są uwalniane do krwi w wyniku apoptozy lub martwicy jako wolne od komórek DNA nowotworowe (ctDNA), przy czym stwierdzono, iż proces metylacji DNA u pacjentów z nowotworami różni się od fizjologicznego obserwowanego u osób zdrowych. Dlatego też wykrywanie zmian w profilu metylacji ctDNA we krwi może być wykorzystane do wykrywania nowotworów. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że badanie profilu metylacji może odróżnić pacjentów z rakiem piersi od osób zdrowych, z czułością ponad 83% i specyficznością ponad 90% [248].

Kolejną nową jak dotąd dobrze nieprzebadaną grupą białek są białka błonowe kaweole CAV1 i CAV2, których naekspresja jest często powiązana z rakami potrójnie ujemnymi i wysokim stopniem histologicznym zaawansowania choroby [249]. Jednym ze sposobów leczenia nowotworów piersi jest stosowanie leków, które oddziałują na strukturę mikrotubul. Białko ATIP3 jest związane z mikrotubulami i wpływa na wydłużenie czasu podziału komórki i tym samym hamuje proliferację. U pacjentów z inwazyjnym rakiem piersi oraz z przerzutami wykazano istotnie niższy poziom o 75% białka ATIP3. Biorąc pod uwagę powyższe białko ATIP3 nie tylko jest potencjalnym celem terapeutycznym ale również biomarkerem w raku piersi [250, 251].

Ostatnie doniesienia wykazują, że nieprawidłowy metabolizm kwasów tłuszczowych jest wysoce skorelowany z rakiem piersi, co daje wskazówki do odkrycia potencjalnych nowych markerów raka piersi. Stężenia niektórych kwasów tłuszczowych wydają się być o wiele wyższe u pacjentów z nowotworami piersi w porównaniu do zdrowej populacji [252].

Z powodu braku niewystarczająco skutecznej terapii raka piersi konieczne jest opracowanie nie tylko nowych bezpiecznych i efektywnych leków, ale tak samo testów diagnostycznych w celu wykrywania choroby już na wczesnym etapie, kiedy nie występują żadne objawy u pacjentów.

II. CEL PRACY

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet i główną przyczyną ich zgonów z powodu nowotworów. Pomimo ciągłego postępu w diagnostyce i leczeniu raka nadal problemem jest zbyt późne wykrywanie nowotworów, jak również skuteczność stosowanych terapii, które bardzo często wywołują szereg działań niepożądanych. Przyczyną niepowodzenia leczenia jest również nabywanie oporności na leczenie. Poprawa skuteczności leczenia i zminimalizowanie występowania efektów ubocznych terapii są kluczowe w walce z rakiem piersi.

Duże nadzieje w poszukiwaniu leków o działaniu przeciwnowotworowym pokłada się w możliwości wykorzystania związków pochodzenia naturalnego, w tym związków polifenolowych. Pomimo licznych doniesień i badań, mechanizmy działania tych związków nadal nie są w pełni poznane. Nadal nie wiadomo, w jakich dawkach i kombinacjach należy je podawać, aby osiągnąć najbardziej pożądane efekty zdrowotne. Z jednej strony liczne doniesienia (*in vitro* i *in vivo*) wykazały, że związki pochodzenia naturalnego są w stanie hamować proliferację komórek nowotworowych, indukować apoptozę, zapobiegać przerzutom, a z drugiej strony mogą mieć zupełnie odwrotne działanie i stymulować proces nowotworowy i stąd istnieje potrzeba prowadzenia badań w tym kierunku.

Ponadto duże oczekiwania wiąże się z nanotechnologią - stosowaniem związków w postaci nanocząstek, które ze względu na swoje niewielkie rozmiary mogą wykazywać inne właściwości niż ich odpowiedniki w postaci makrocząstek. Należy zaznaczyć, że w piśmiennictwie brakuje danych dotyczących zarówno ich korzystnej aktywności przeciwnowotworowej, jak i bezpieczeństwa stosowania.

Celem pracy była ocena działania nano, mikro i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego 7,12-dimetylobenzoo[*a*]antracenenem u szczurów.

Tezy szczegółowe:

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.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał biologiczny do badań

Materiałem biologicznym do badań były: mocz, surowica krwi, guzy, narządy (wątroby, śledziona) pozyskane od samic szczurów szczepu Sprague-Dawley (n=32). Zwierzęta pochodziły z Centralnego Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym - numer dokumentu - 645/2018.

W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w kontrolowanych warunkach oraz miały zapewniony stały dostęp do wody i paszy. Były karmione dietą standardową Labofeed H (Labofeed H, Żurawia 19, 89-240 Kcynia, Polska). Temperatura pomieszczenia była utrzymywana w granicy 22°C, zachowany był 12-godzinny cykl dzień-noc.

Doświadczenie trwało 100 dni. Po 10 dniowym okresie adaptacji do warunków eksperymentu zwierzęta zostały losowo podzielone na 4 grupy:

- **GRUPA 1** - grupa kontrolna, zwierzęta pozbawione suplementacji genisteiną, które, w celu zachowania warunków eksperymentalnych, otrzymywały za pomocą sondy dożołądkowej 0,4 ml wody.
- **GRUPA 2** - zwierzęta suplementowane makrogenisteiną, zawieszoną w 0,4 ml wody, podawaną za pomocą sondy dożołądkowej, w dawce 0,2 mg/kg m.c.
- **GRUPA 3** - zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną, w postaci cząstek o wielkości 587 ± 83 nm, zawieszoną w 0,4 ml wody, podawaną za pomocą sondy dożołądkowej w dawce 0,2 mg/kg m.c.
- **GRUPA 4** - zwierzęta suplementowane nanogenisteiną, w postaci cząstek o wielkości 92 ± 41 nm, zawieszoną w 0,4 ml wody, podawaną za pomocą sondy dożołądkowej w dawce 0,2 mg/kg m.c.

Nanoczątki i mikroczątki genisteiny przygotowane zostały przy współpracy z Katedrą Chemii Analitycznej i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Genisteina

w formie makro została zastosowana w postaci otrzymanej od producenta (genisteina o czystości > 98.0%, firmy Tokyo Chemical Industries, Portland, OR, USA).

Procedura otrzymywania nanogenisteiny

Do 400 ml intensywnie mieszanego (7000 obr./min) 2,5% roztworu polialkoholu winylowego (PVA), dodawano kroplami stężony roztwór genisteiny (1 g) w octanie etylu i następnie mieszano przez 5 minut. Uzyskaną roztwór homogenizowano przez 15 min z wykorzystaniem homogenizatora ultradźwiękowego firmy Scientz JY-92 - IIDN 900 Watt (Staufen, Niemcy) z końcówką tytanową 6 mm. Zastosowano następujące parametry homogenizacji: puls - 4,5 s, interwał pulsu - 0,5 s, moc - 75%. Następnie mieszaninę powoli mieszano (900 obr./min) ogrzewając do temperatury 40°C. Homogenizację powtarzano co 24 godziny, aż do całkowitego usunięcia octanu etylu. Uzyskaną mieszaninę rozcieńczono 3 krotnie wodą destylowaną i odwirowano (15 min, 4500 obr./min). Otrzymane nanocząstki wielokrotnie przemywano wodą destylowaną, odwirowywano aż do usunięcia nadmiaru PVA i suszono w temperaturze pokojowej pod próżnią przez 24 godziny. W wyniku zastosowania powyższej procedury otrzymano 1 g genisteiny w formie nanocząstek.

Procedura otrzymywania mikrogenisteiny

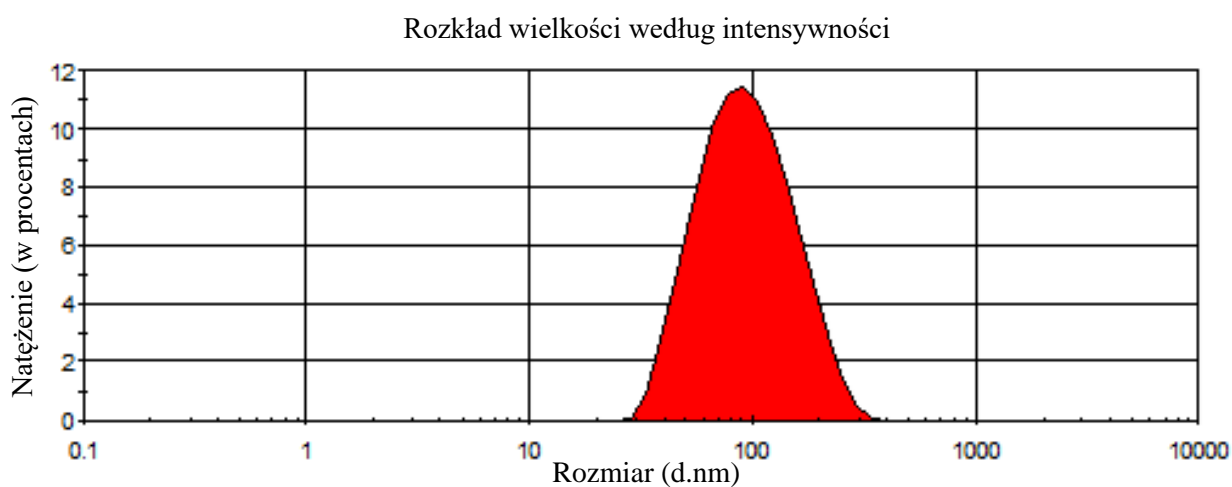
Forma mikronizowana genisteiny została przygotowana poprzez zmielenie makrogenisteiny w młynie kriogenicznym SPEX Sample Prep 6770 Freezer/Mill (Retsch Polska Verder Polska Sp. z oo, Katowice, Polska). Zastosowano następujące warunki procesu: chłodziwo: ciekły azot, czas wstępnego schładzania: 1 min, czas mikronizowania: 2 min, czas chłodzenia: 1 min, tempo: 900 obr./min.

W celu zbadania średniej wielkości cząstek genisteiny oraz ich potencjału zeta zastosowano metodę dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Do badań wykorzystano analizator Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA, USA) wyposażony w laser o długości fali 633 nm i kącie rozpraszania 173° w 25°C. Do badań cząstki zawieszono w wodzie destylowanej (pomiar potencjału Zeta) lub w wodnym roztworze gliceryny (pomiar wielkości). Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabeli 8 oraz na rycinach 14 i 15.

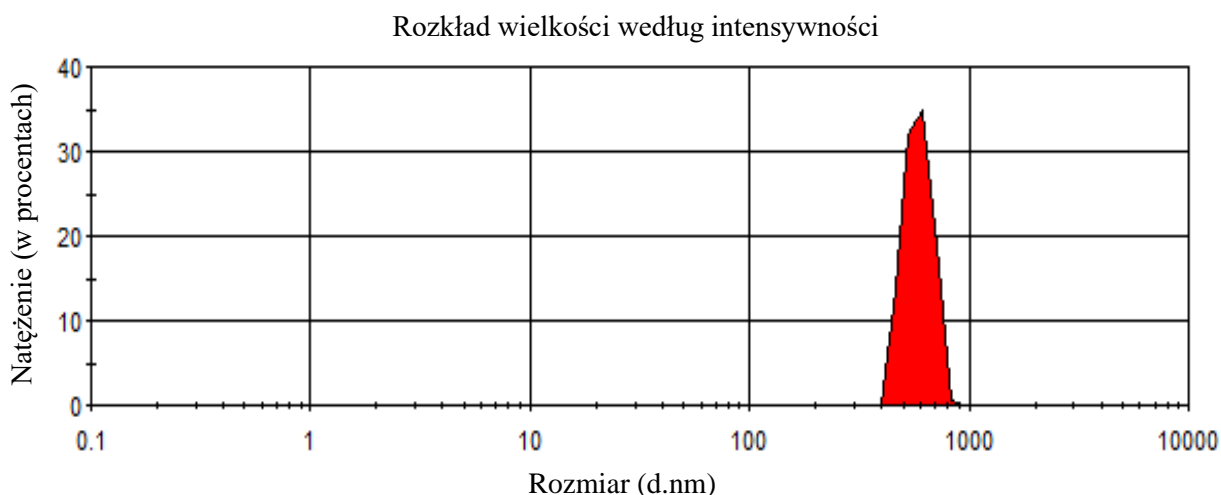
Tabela 8. Wyniki badań wielkości i potencjału zeta cząstek nano i mikrogenisteiny.

DLS parametry	Rozmiar (d.nm) ^a	Z-średnia (d.nm)	Potencjał zeta ^b [mV]	Đ ^c
Genisteina w formie nano	92 ± 41	158	-17.2 ± 5.5	1,000
Genisteina w formie mikro	587 ± 83	1467	-30.2 ± 6.0	0,873

^a - rozmiar ± wartość odchylenia standardowego; ^b - potencjał zeta ± wartość odchylenia standardowego; ^c - rozproszenie.



Rycina 14. Rozkład wielkości nanocząstek genisteiny.

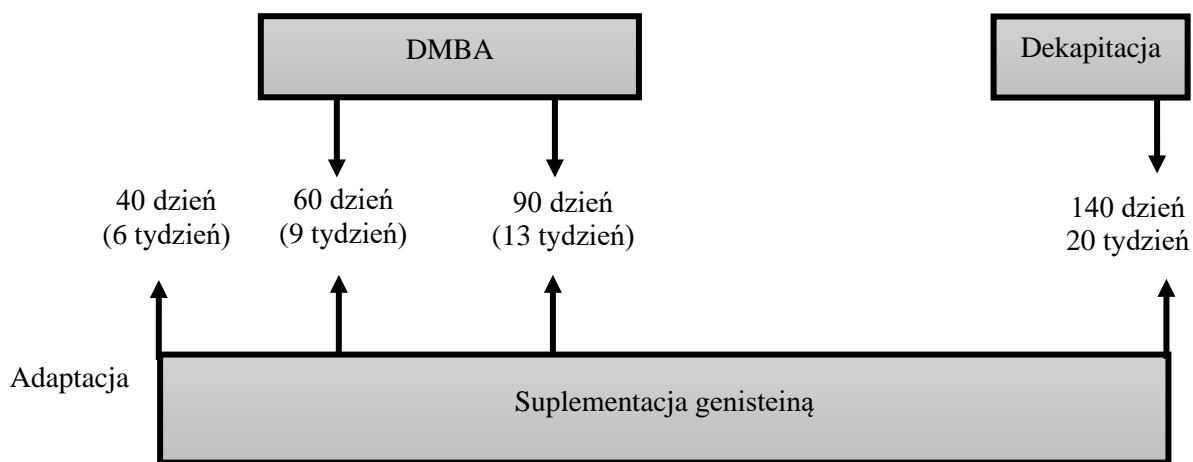


Rycina 15. Rozkład wielkości mikrocząstek genisteiny.

Zastosowaną dawkę genisteiny ustalono na podstawie wartości jej średniego dziennego spożycia z dietą przez ludzi z ekstrapolacją na masę ciała szczurów [253]. Szczury były suplementowane od 40 dnia życia do 20 tygodnia życia.

W celu wywołania nowotworu sutka (gruczolakoraka, *adenocarcinoma*), szczurom dwukrotnie podano sondą dożołądkową 7,12-dimetylobenzo[a]antracen (DMBA) (firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozpuszczony w oleju rzepakowym. Pierwsza dawka - 80 mg/kg masy ciała - została podana w 60 dniu życia zwierząt, a następną - 40 mg/kg masy ciała - w 90 dniu życia zwierząt.

Schemat doświadczenia oceny wpływu suplementacji nano, mikro, makrogenisteiną na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów przedstawiono na rycinie 16.



Rycina 16. Schemat przebiegu badania z udziałem zwierząt.

Materiałem biologicznym do badań były: mocz, surowica krwi, guzy, narządy (wątroby, śledziony) samic szczurów szczepu Sprague-Dawley. W celu pobrania moczu zwierzęta umieszczano indywidualnie w klatkach metabolicznych na 24 godziny. Surowicę uzyskano ze świeżej krwi (pobieranej podczas uśmiercania zwierząt) przez odwirowanie w wirówce przy 3000 obr./min w temperaturze 4°C. Materiał biologiczny przechowywano do czasu wykonania właściwych analiz w lodówce niskotemperaturowej w temperaturze -70°C.

2. Ocena procesu tworzenia i wzrostu guzów

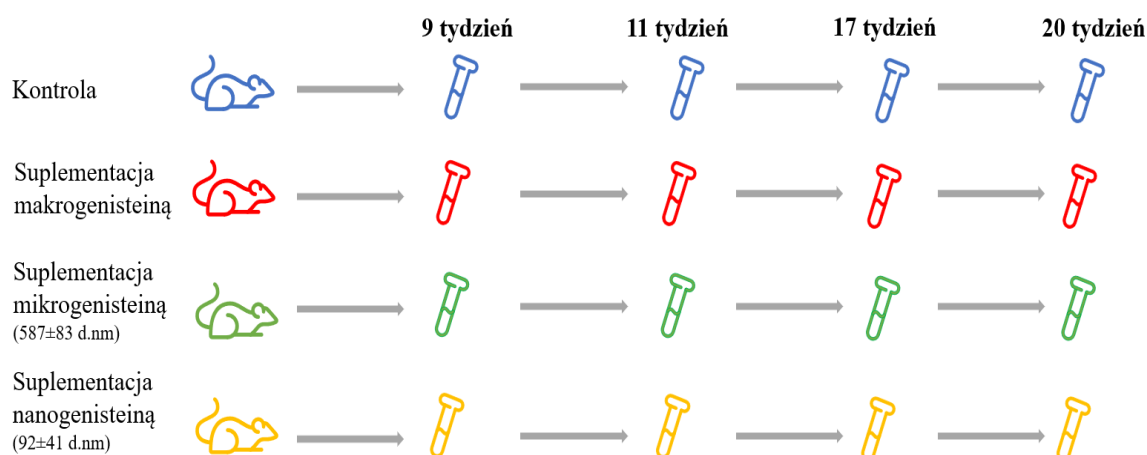
Ocena przebiegu procesu tworzenia i wzrostu guzów nowotworowych była wykonywana na podstawie badania palpacyjnego zwierząt. Badanie palpacyjne szczurów wykonywano raz w tygodniu i na podstawie tej dokonano oceny czasu, w którym pojawiły się pierwsze guzy w grupie oraz częstości występowania guzów w grupie, liczby guzów u jednego szczura oraz masy guzów.

3. Ocena histopatologiczna materiału biologicznego

Badanie histopatologiczne guzów nowotworowych wykonane zostało przy współpracy z Katedrą Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Materiał do badań (guzy nowotworowe) umieszczono w 10% buforowanym roztworze formaliny, następnie poddano procesowi dehydratacji, zatopiono w parafinie i pocięto na skrawki o grubości 4 μm . Fragmenty tkanek barwiono hematoksyliną i eozyną, a następnie oceniano przy użyciu mikroskopu typu BX43 Olympus (Olympus Europa SE & Co., Hamburg, Niemcy). Dokonano również oceny liczby mitoz w obszarze pola widzenia mikroskopu (przy 40-krotnym powiększeniu obiektywu).

4. Ocena zawartości metylowanych pochodnych nukleozydów (zasad) w moczu szczurów

W celu oznaczenia zawartości 1-metyloadeniny, 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, O-metyloguanozyny oraz N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu szczurów wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Badania prowadzone były przy współpracy z Zakładem Bioanalizy i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM. Materiałem do badań były próbki moczu pochodzące z 9, 11, 17 i 20 tygodnia życia zwierząt, tj z okresu przed podaniem czynnika kancerogenego (9 tydzień), tuż po podaniu DMBA (11 tydzień), z okresu pojawienia się w grupach pierwszych palpacyjnie wyczuwalnych guzów (17 tydzień) oraz na zakończenie eksperymentu, gdy guzy były w pełni uformowane (20 tydzień) (Rycina 17).



Rycina 17 . Schemat procedury doświadczalnej pobierania próbek moczu.

Badania wykonano zgodnie z procedurą przedstawioną w pracy Roćkowskiej i wsp. [254] . Do 0,1 ml próbki moczu dodawano standard wewnętrzny - 0,1 ml tubercidinu (1 µg/ml) oraz 0,6 ml acetonitrylu. Próbkę wortexowano przez 3 min, a następnie odwirowano przez 5 min (9449 obr./min⁰). Zmodyfikowane nukleozydy i zasady oznaczano za pomocą metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas z zastosowaniem trybu monitorowania reakcji następczych (MRM) aparatem firmy Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) w połączeniu z QTRAP 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Przejścia MRM, potencjał deklasteryzacji (DP) i energia zderzenia (CE) dla poszczególnych związków O-metyloguanozyny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, 7-metyloguaniny, 3-metyloadeniny, 1-metyloguaniny i N6-metylo-2'-deoksyadenozyny wynosiły odpowiednio: (m/z) 298>152 (DP=51 V, CE=17 V), 282>55 (DP=66 V, CE=87 V), 298>166 (DP=71 V, CE=19 V), 166 >79 (DP=96 V, CE=43 V), 150>123 (DP=86 V, CE=31 V), 166>135 (DP=81 V, CE=31 V) i 266>150 (DP= 61 V, CE=23 V).

Do badań zastosowano kolumnę chromatograficzną typu SeQuant® ZIC®-HILIC (50×2,1 mm, 5 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Temperatura kolumny wynosiła 25°C. Szybkość przepływu ustalono na 0,5 ml/min. Rozdział chromatograficzny prowadzono stosując następujący skład fazy ruchomej: eluent A: 20 mM octan amonu; eluent B: 0,2% kwas mrówkowy w acetonitrylu. Gradient (%B): 0 min, 95%; 1 min, 95%; 7 min, 50%; 8 min, 50%. Objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. W celu identyfikacji poszczególnych metylo pochodnych w próbkach moczu wykorzystano roztwory wzorcowe poszczególnych związków.

Zawartość zmodyfikowanych nukleozydów i zasad w moczu szczurów standaryzowano poprzez przeliczenie na zawartość kreatyniny.

5. Oznaczenie stężenia kreatyniny w moczu szczurów

Zawartość kreatyniny w próbkach moczu oznaczono z wykorzystaniem testu kreatynina end point firmy Hydrex (Warszawa, Polska). Zasada działania testu opiera się na reakcji Jeffe'go - tworzenia barwnego (pomarańczowo-czerwonego) kompleksu kreatyniny z pikrynianem sodu.

Stężenie kreatyniny w moczu oznaczono zgodnie z procedurą opracowaną przez producenta testu, metodą kolorymetryczną, przy długości fali 492 nm, z zastosowaniem spektrofotometru firmy Helios Gamma (firmy Thermo Spectronic, Wielka Brytania). Natężenie barwy próbki i tym samym absorbancja były wprost proporcjonalne do stężenia kreatyniny w materiale biologicznym.

6. Oznaczanie zawartości kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów

Do oznaczenia zawartości kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów wykorzystano metodę chromatografii gazowej z detektorem spektrometrii mas czasu przelotu (GC/TOFMS). Badania wykonano w oparciu o metodykę przestawioną w pracy Stawarska i wsp. [255].

Do 200 μ l surowicy krwi dodawano 1 ml 0,5 M NaOH w metanolu, 25 μ l wzorca wewnętrznego (kwasu nonadekanowego (C19:0) w toluenie, 1 mg/ml) i ogrzewano w temperaturze 80°C przez 15 minut. Następnie dodawano 1 ml roztworu trifluorku boru (BF₃) w metanolu (14% w/v) i ponownie ogrzewano w 80°C przez 15 minut. Kolejnym etapem było przeprowadzenie ekstrakcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) przez dodanie 2. ml nasyconego roztworu NaCl w wodzie, 1 ml heksanu i wytrząsanie. Po rozdzieleniu faz warstwę organiczną przenoszono do naczynka o pojemności 2 ml, a następnie podawano na kolumnę chromatograficzną.

Do badań wykorzystano chromatograf gazowy ze spektrometrią mas czasu przelotu typu Pegasus® BT (firmy LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Rozdziału dokonano stosując kolumnę chromatograficzną typu: TR-FAME 120 m/0,25 mm ID/grubość warstwy 0,25 μm (firmy Thermo Fisher Scientific Inc., Göteborg, Szwecja). Jako gaz nośny zastosowano hel ze stałym przepływem 1 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 1 μl , w trybie bez podziału strumienia (splitless). Rozdział chromatograficzny prowadzono w programie temperaturowym: 110°C (16 min); 6°C/min do 190°C; 1°C/min do 210°C; 0,4°C/min do 220°C, 220°C (10 min). Temperatura źródła jonów wynosiła 250°C, a energia 70eV. W celu identyfikacji poszczególnych kwasów tłuszczowych obecnych w próbkach wykorzystano materiał wzorcowy: standard FAME (Supelco 37 Component FAME Mix, firmy Sigma, St. Louis, MO, USA).

7. Oszacowanie aktywności $\Delta 5$ -desaturazy oraz $\Delta 6$ -desaturaz w surowicy krwi szczurów

Indeksy aktywności poszczególnych desaturaz obliczono, jako stosunek produktu do substratu, w oparciu o zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów, na podstawie zależności przedstawionych w pracy Stawarska i wsp. [256] oraz Muto i wsp. [257]. Wartość wskaźnika $\Delta 6$ -desaturazy (D6D) stanowił stosunek stężenia kwasu γ -linolenowego (C18:3, n-6) do stężenia kwasu linolowego (C18:2, n-6). Wartość wskaźnika $\Delta 5$ -desaturazy (D5D) obliczona została na podstawie stężenia kwasu arachidonowego (AA, C20:4, n-6) w stosunku do stężenia kwasu dihomog γ -linolenowego (DGLA, C20:3, n-6).

$$D5D = \frac{C20:4}{C20:3}$$

$$D6D = \frac{C18:3}{C18:2}$$

D5D: wartość wskaźnika $\Delta 5$ -desaturazy; C20:4: (C20:4 n-6), kwas arachidonowy (AA); C20:3: (C20:3 n-6), kwas dihomog γ -linolenowy (DGLA); D6D: wartość wskaźnika $\Delta 6$ -desaturazy; C18:3: (C18:3 n-6), kwas γ -linolenowy (GLA); C18:2: (C18:2 n-6), kwas linolowy (LA).

8. Oszacowanie wskaźników aterogenności i trombogenności surowicy krwi szczurów

Oceny wpływu suplementacji zwierząt genisteiną na wartości indeksu aterogenego (AI), indeksu trombogenego (TI) oraz stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych (h/H) surowicy krwi szczurów dokonano w oparciu o zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych na podstawie zależności przedstawionych w pracy Paszczyk i wsp. [257].

Wartość indeksu aterogenego (AI) obliczono z wykorzystaniem następującej proporcji:

$$AI = \frac{C12:0 + (4 * C14:0) + C16:0}{\Sigma \text{MUFA} + \Sigma n - 6 \text{PUFA} + \Sigma n - 3 \text{PUFA}}$$

AI, wartość indeksu aterogenego; C12:0: kwas laurynowy; C14:0: kwas mirystynowy; C16:0: kwas palmitynowy; Σ : suma; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; n-6 PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe z wiązaniem podwójnych w pozycji 6 łańcucha węglowego; n-3 PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe z wiązaniem podwójnych w pozycji 3 łańcucha węglowego.

Wartość indeksu trombogeny (TI) obliczono z wykorzystaniem następującej zależności:

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{(0.5 \times \Sigma \text{MUFA}) + (0.5 \times \Sigma n - 6 \text{PUFA}) + (3 \times \Sigma n - 3 \text{PUFA})} + \frac{\Sigma n - 3 \text{PUFA}}{\Sigma n - 6 \text{PUFA}}$$

TI: wartość indeksu trombogenego; C14:0: kwas mirystynowy; C16:0: kwas palmitynowy; C18:0: kwas stearynowy; Σ : suma; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; n-6 PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe z wiązaniem podwójnych w pozycji 6 łańcucha węglowego; n-3 PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe z wiązaniem podwójnych w pozycji 3 łańcucha węglowego.

Stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych (h/H) obliczono z wykorzystaniem równania podanego przez Fernándeza i wsp. [258]

$$h/H = \frac{C18:1 + C18:2 + C18:3 + C20:3 + C20:4 + C20:5 + C22:6}{C14:0 + C16:0}$$

h/H: stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych; C18:1: (C18:1 n-9) kwas oleinowy; C18:2: (C18:2 n-6) kwas linolowy; C18:3: (C18:3 n-3) kwas α -linolenowy (ALA); C20:3: (C20:3 n-6), kwas dihomo- γ -linolenowy (DGLA); C20:4: (C20:4 n-6), kwas arachidonowy (AA); C20:5: (C20:5 n-3), kwas eikozapentaenowy; C22:6: (C22:6 n-3), kwas dokozaheksaenowy; C14:0: kwas mirystynowy; C16:0: kwas palmitynowy.

9. Oznaczenie zawartości kwasów: 5-, 12- i 15-HETE, 12-HEPE i HODE w surowicy krwi szczurów

Zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych (5-, 12- i 15-HETE), kwasu 12-hydroksyeikozapentaenowego oraz kwasów hydroksyoktadekadienowych (HODE) w surowicy krwi szczurów suplementowanych nano, mikro i makrogenisteiną oznaczono z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (HPLC/UV) w oparciu o metodykę opracowaną przez Frohberga i wsp. [259].

W celu ekstrakcji kwasów 5,12,15-HETE, 12-HEPE oraz HODE wykorzystano kolumnienki Bakerbond C18 500 mg/ 3 ml (firmy SPE, J.T. Baker, Holandia). Złoże kolumnienek wstępnie kondycjonowano metanolem, a następnie wodą po 10 ml na każdą kolumnienkę. Do próbki surowicy (0,4 ml) dodawano 0,5 ml 10% metanolu, a następnie naniesiono na kolumnienkę. Po przemyciu 2. ml wody i 2. ml 10% metanolu badane związki wmywano czystym metanolem (100%) (3 x 0,5 ml). Próbki odparowano do sucha pod strumieniem azotu w temperaturze 37°C i rozpuszczano w 100 μ l etanolu. Przed podaniem na kolumnę chromatograficzną każdą próbkę oczyszczano stosując filtr o wielkości porów 0,22 μ m (Ultrafree- MC, Durapore PVDF, 0,22 μ m, firmy Millipore, USA) . Zawartość metabolitów kwasów tłuszczowych oznaczono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego z pompą typu LC-20AD, detektorem UV/VIS SPD-10AV i piecem CT0-10AS (firmy Shimadzu, USA).

Badane związki rozdzielono na kolumnie chromatograficznej typu C18 Kinetex o parametrach 2,6 μm , 100 mm x 4,6 mm (firmy Phenomenex, USA). Analizę przeprowadzono stosując następujące układy faz: A - metanol : kwas octowy (100:0,01) i B: 0,01% kwas octowy. Skład fazy ruchomej zmieniał się w czasie w następujący sposób: A:B - 70:30 - 11 min; 73:27 - 18 min; 90:10 - 25 min, 70:30 - 5 min. Szybkość przepływu wynosiła 0,8 ml/min, a temperatura kolumny 35°C. Na kolumnę chromatograficzną nanoszono 4 μl próbki. Zawartość metabolitów kwasów tłuszczowych oznaczano przy długości fali 235 nm. Analizę badanych związków przeprowadzono w oparciu o roztwory wzorcowe: HODE, 12-HEPE, 5-, 12-, 15-HETE (firmy Cayman Chemicals, USA).

10. Oznaczanie zawartości interleukiny 1, interleukiny 6 oraz metaloproteinazy 9 w surowicy krwi szczurów

Zawartość interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 6 (IL-6) oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9) w surowicy krwi szczurów suplementowanych nano, mikro, makrogenisteiną oznaczono z wykorzystaniem metody immunoenzymatycznej (ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Do badań zastosowano komercyjnie dostępne testy: Rat Interleukin - 6 (IL-6) ELISA Kit (numer katalogowy: orb219833); Rat Interleukin - 1 (IL-1) ELISA kit (numer katalogowy: 219820); firmy Biorbyt (Biorbyt® Ltd., 5, Orwell Furlong, Cowley Road, Cambridge, Cambridgeshire, CB4 0WY, Wielka Brytania) oraz Rat matrix metalloproteinase - 9 ELISA Kit (numer katalogowy: E0553r) firmy Wuhan Eiaab Science Co LTD (Wuhan Eiaab Science Co LTD Beneficiary, A1710 Guangguguoji, East Lake Hi-Tech Development Zone, Wuhan 430079, China). Podczas wykonywania testów zastosowano procedury badawcze zgodne z instrukcjami producentów.

Do oznaczania IL-6, IL-1 oraz MMP9 wykorzystano spektrofotometr firmy Bio-Tek Instruments (JNC, Highland Park, Box 998, Winooski UT 05,404 - 0998, USA).

11. Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań

Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego PQStat wersja 1.8.2.212.

Wyniki badań porównywano z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc testem Tukeya. Za istotne uznano prawdopodobieństwo testowe na poziomie $p < 0,05$, a za wysoce istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie $p < 0,01$.

IV. WYNIKI

1. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów

Zebrane dane oceny wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na wybrane parametry świadczące o rozwoju i przebiegu procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów przedstawiono w tabelach 9 i 10. Wyniki badania histopatologicznego guzów nowotworowych przedstawiono na rycinie 18.

Tabela 9. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów.

Badany parametr	Grupa			
	Standard	Makro	Mikro	Nano
Czas w którym pojawiły się pierwsze guzy	16 tydzień	17 tydzień	17 tydzień	14 tydzień
Liczba guzów u jednego osobnika*	2-9	1-6	0-3	2-5
Częstość występowania guzów w grupie (%)*	100% (8/8)	100% (8/8)	88% (7/8)	100% (8/8)
Masa guzów (g), średnia \pm SD*	0,93 \pm 1,34 (0,10-7,80) ^a	1,27 \pm 1,52 (0,14-6,39) ^{ab}	1,99 \pm 1,75 (0,11-6,11) ^b	1,59 \pm 2,64 (0,06-9,50) ^b
Wynik badania histopatologicznego	Rak gruczołowy 2. stopnia	Rak gruczołowy 2. stopnia	Rak gruczołowy 3. stopnia	Rak gruczołowy 3. stopnia
Średnia liczba mitoz w obszarze pola widzenia**	1,79 \pm 1,25 ^a	4,46 \pm 2,38 ^b	7,33 \pm 1,57 ^c	5,82 \pm 1,57 ^{bc}

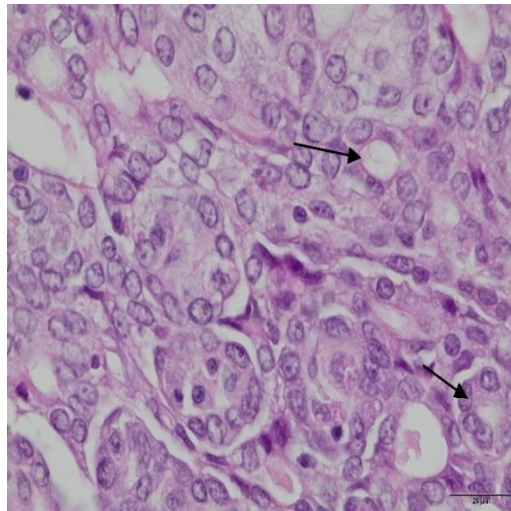
Dane wyrażone są jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe (SD). Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; a,b,c : grupy jednorodnie. Grupy jednorodnie - taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$). *20 tydzień życia zwierząt; **liczba mitoz była obliczona w preparatach losowo wybranych guzów z 15. pól widzenia przy 40 \times powiększeniu obiektywu.

Tabela 10. Zapadalność na nowotwory (%) w poszczególnych grupach szczurów w zależności od czasu badania - wyniki badania palpacyjnego.

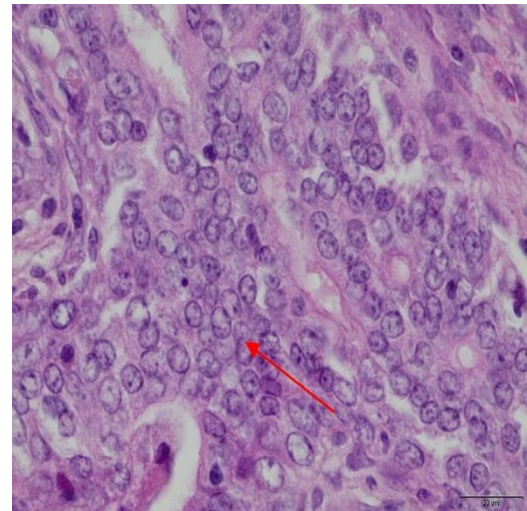
Suplementacja	Zapadalność (%)						
	Tydzień 14	Tydzień 15	Tydzień 16	Tydzień 17	Tydzień 18	Tydzień 19	Tydzień 20
Standard	0/8	0/8	2/8 (25%)	5/8 (63%)	6/8 (75%)	7/8 (88%)	8/8 (100%)
Makro	0/8	0/8	0/8	5/8 (63%)	6/8 (75%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)
Mikro	0/8	0/8	0/8	1/8 (13%)	3/8 (38%)	4/8 (50%)	7/8 (88%)
Nano	1/8 (13%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)	2/8 (25%)	4/8 (50%)	6/8 (75%)	8/8 (100%)

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną.

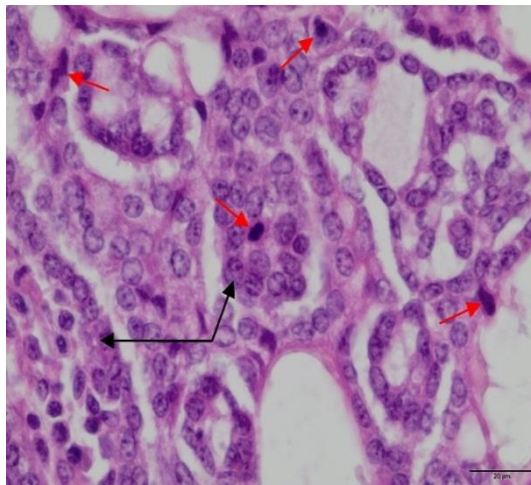
Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zapadalność na nowotwory wynosiła 100% we wszystkich grupach badawczych za wyjątkiem zwierząt suplementowanych mikrogenisteiną (88%) (Tabela 9, Tabela 10). Pierwsze palpacyjnie wyczuwalne guzy pojawiły się w grupie zwierząt suplementowanych nanogenisteiną już w 14 tygodniu życia zwierząt (Tabela 9, Tabela 10). W przypadku zwierząt pozbawionych suplementacji pierwsze guzy w grupie pojawiły się w 16 tygodniu (2 tygodnie później w odniesieniu do zwierząt suplementowanych nanogenisteiną), a w przypadku zwierząt suplementowanych mikro i makrogenisteiną w 17 tygodniu (3 tygodnie później w odniesieniu do zwierząt suplementowanych nanogenisteiną). Liczba guzów (oceniana w 20 tygodniu, po uśmierceniu zwierząt) przypadająca na jednego osobnika była zróżnicowana w zależności od stosowanej suplementacji i wynosiła odpowiednio: w przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną w postaci mikro: 0-3; nano: 2-5; makro: 1-6, a w przypadku grupy kontrolnej: 2-9 (Tabela 9). Co ciekawe masa guzów była istotnie statystycznie wyższa w przypadku szczurów suplementowanych mikrogenisteiną (wartość średnia \pm SD: 1,99 \pm 1,75; przedział: 0,11-6,11) oraz nanogenisteiną (wartość średnia \pm SD: 1,59 \pm 2,64; przedział: 0,06-9,50), w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji (wartość średnia \pm SD: 0,93 \pm 1,34; przedział: 0,10-7,80) (Tabela 9).



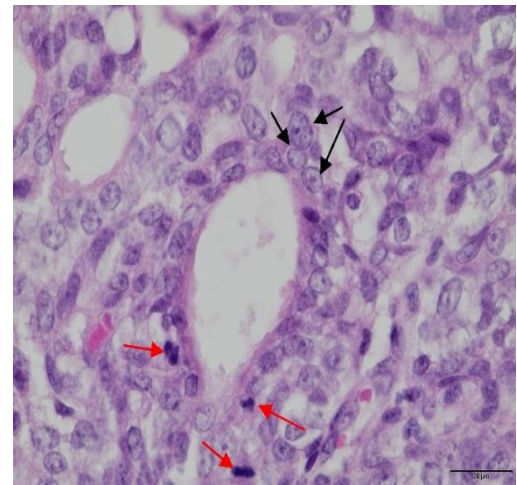
(A)



(B)



(C)



(D)

Rycina 18. Wyniki analizy histopatologicznej guzów indukowanych DMBA u szczurów.

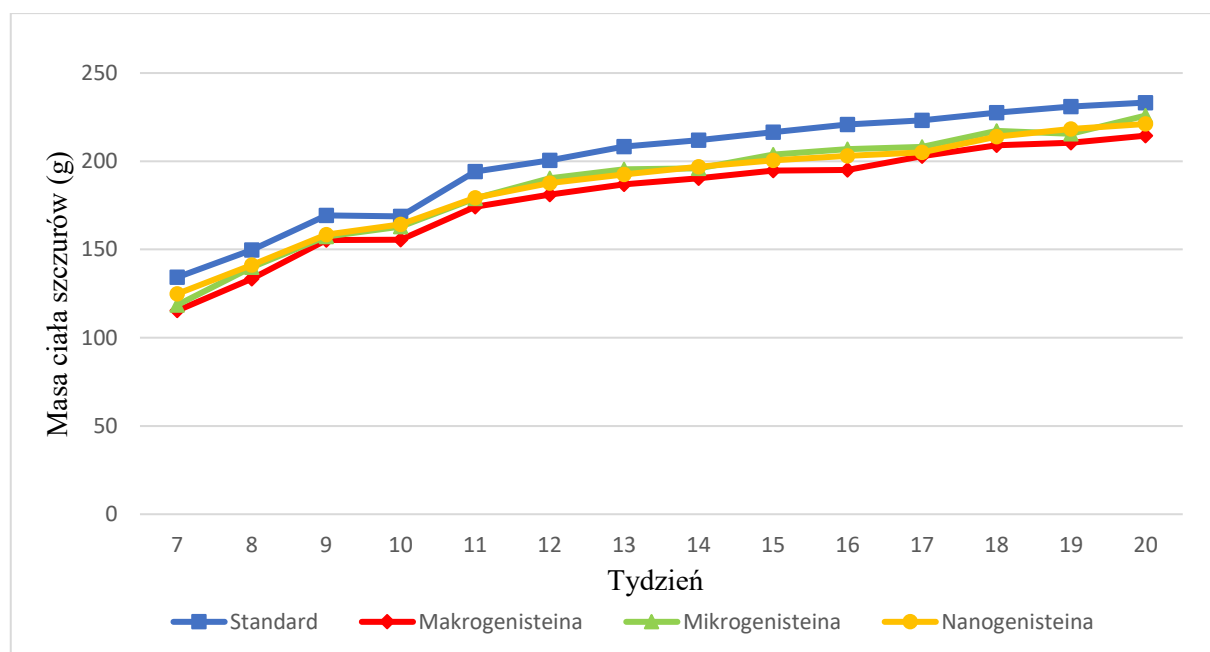
A: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową - bez suplementacji; B: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; C: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; D: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; czerwone strzałki - mitoz; czarne strzałki - komórki rakowe tworzące pęcherzyki.

W badaniu histopatologicznym wykazano, iż wszystkie badane guzy miały cechy raka piersi - *adenocarcinoma*. U zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawioną suplementacji) oraz u zwierząt suplementowanych makrogenisteiną stwierdzono gruczolaka II stopnia (Tabela 9, Rycina 18). W próbkach guzów pozyskanych od zwierząt suplementowanych mikrogenisteiną oraz nanogenisteiną obraz badania histopatologicznego wskazywał na III stopień złośliwości. W grupach zwierząt, które suplementowane były genisteiną wykazano wzrost intensywności proliferacji komórek nowotworowych, o czym świadczy liczba mitoz w polu widzenia mikroskopu (przy 40-krotnym powiększeniu

obiektywu), w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji. Średnia liczba mitoz w przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (wartość średnia \pm SD: $1,79 \pm 1,25$) i wynosiła odpowiednio: wartość średnia \pm SD: $7,33 \pm 1,57$ (mikrogenisteina), wartość średnia \pm SD: $5,82 \pm 1,57$ (nanogenisteina), $4,46 \pm 2,38$ (makrogenisteina) (Tabela 9).

2. Wpływ suplementacji nano, mikro i makrogenisteiną na masę ciała badanych zwierząt i masę ich narządów

Dane dotyczące kinetyki zmian (7 - 20 tydzień życia zwierząt) masy ciała (g) zwierząt traktowanych DMBA i suplementowanych genisteiną w formach makro, mikro i nano oraz zwierząt pozbawionych suplementacji przedstawiono na rycinie 19.



Rycina 19. Kinetyka zmian (7-20 tydzień) masy ciała (g) zwierząt doświadczalnych.

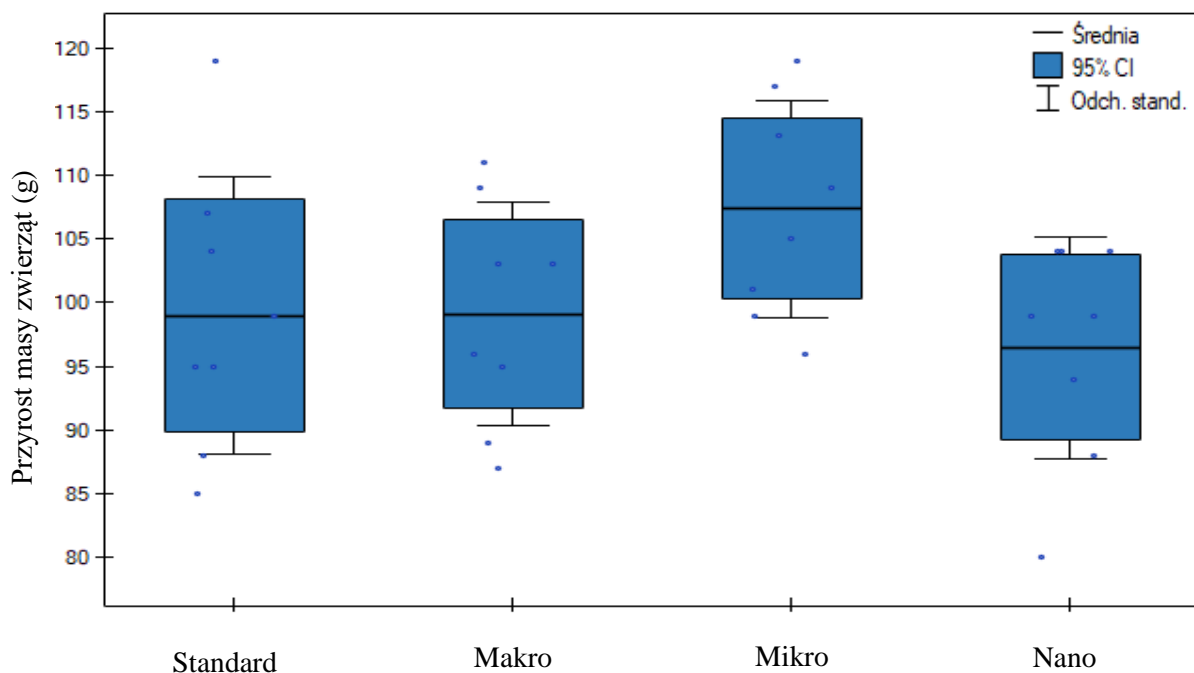
g: gramy

Wyniki analizy statystycznej przyrostu masy ciała szczurów (7-20 tydzień życia szczurów) w zależności od stosowanej suplementacji przedstawiono w tabeli 11 i na rycinie 19.

Tabela 11. Analiza statystyczna wyników badań przyrostu masy szczurów (7-20 tydzień życia szczurów) (g) w zależności od stosowanej suplementacji.

	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
Przyrost masy szczurów (g)	99,00±10,94	99,12±8,82	107,40±8,54	96,50±8,54	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$).



Rycina 20. Wpływ suplementacji genisteiną w postaci makro, mikro i nano na przyrost masy szczurów (g) traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy.

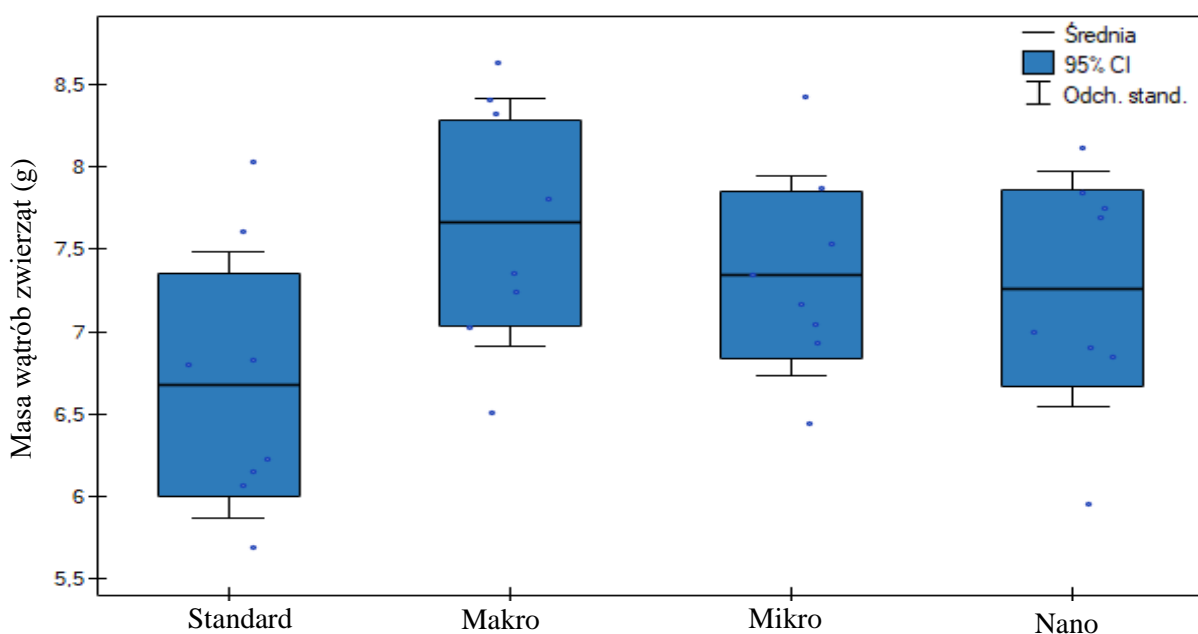
Na podstawie uzyskanych wyników badań nie wykazano istotnie statystycznych różnic w przyroście masy ciała zwierząt (g) w okresie 13 tygodni (od 7 do 20 tygodnia życia szczurów) w zależności od stosowanej suplementacji (Tabela 11, Rycina 20).

Wyniki badań analizy statystycznej masy narządów (g): wątroby i śledziony zwierząt suplementowanych nano, mikro i makrogenisteiną w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji przedstawiono w tabelach 12, 13 i na rycinach 21 i 22. Materiał do badań uzyskano w 20 tygodniu życia zwierząt podczas ich dekapitacji.

Tabela 12. Analiza statystyczna wyników badań masy wątrób (g) zwierząt doświadczalnych w zależności od stosowanej suplementacji.

	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
Masa wątrób szczurów (g)	6,68±0,81	7,66±0,75	7,34±0,61	7,26±0,71	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$).



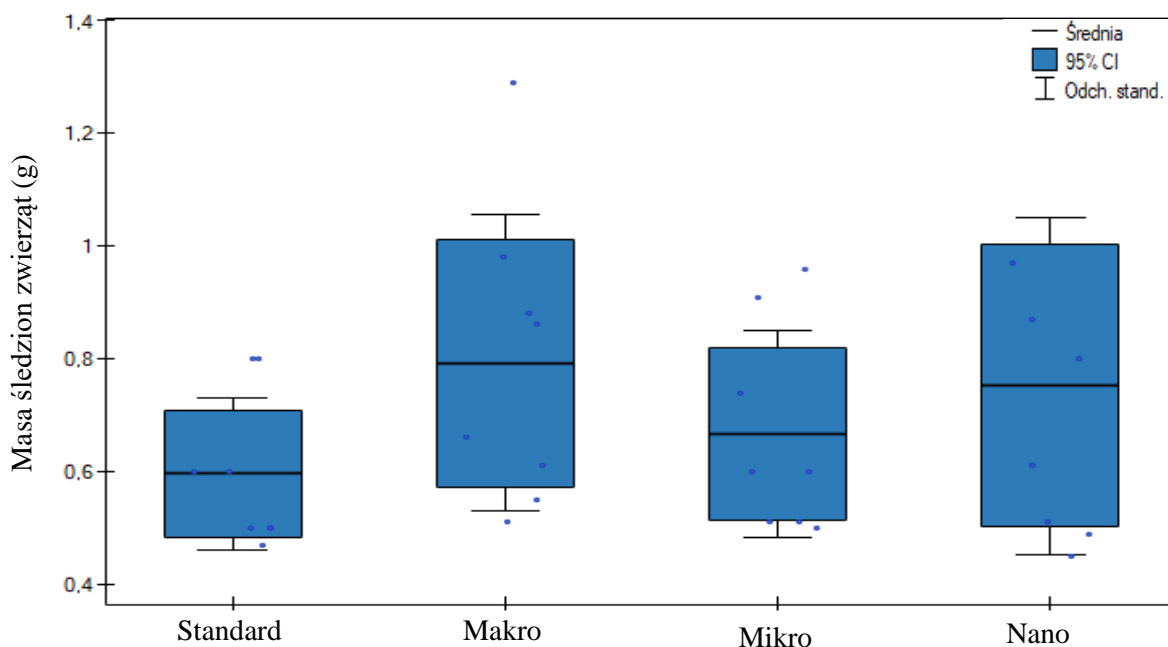
Rycina 21. Wpływ suplementacji genisteiną w postaci makro, mikro i nano na masy wątrób szczurów (g) traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy.

Tabela 13. Analiza statystyczna wyników badań masy śledzion (g) zwierząt doświadczalnych w zależności od stosowanej suplementacji.

	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
Masa śledzion szczurów (g)	0,59±0,13	0,79±0,26	0,67±0,18	0,75±0,30	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$).



Rycina 22. Wpływ suplementacji genisteiną w postaci makro, mikro i nano na masy śledzion szczurów (g) traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; g: gramy.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że masy śledzion i wątroby szczurów suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną były wyższe w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji), jednakże ze

względu na wysokie wartości odchylenia standardowego nie były to wartości istotne statystycznie (Tabela 12, Tabela 13 , Rycina 21, Rycina 22).

3. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian zawartości pochodnych nukleozydów/zasad w moczu szczurów

Dokonano oceny wpływu suplementacji genisteiną w postaci nano, mikro i makro na kinetykę zmian zawartości modyfikowanych metylowych pochodnych: O-metyloguanozyny, 3-metyloadeniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguaniny, 7-metyloguanozyny, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu szczurów indukowanych w celu wywołania nowotworu sutka 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Próbki moczu pochodziły z okresu przed podaniem czynnika kancerogennego (9 tydzień), tuż po podaniu DMBA (11 tydzień), z okresu tworzenia się pierwszych wyczuwalnych guzów (17 tydzień) i zakończenia eksperymentu (20 tydzień).

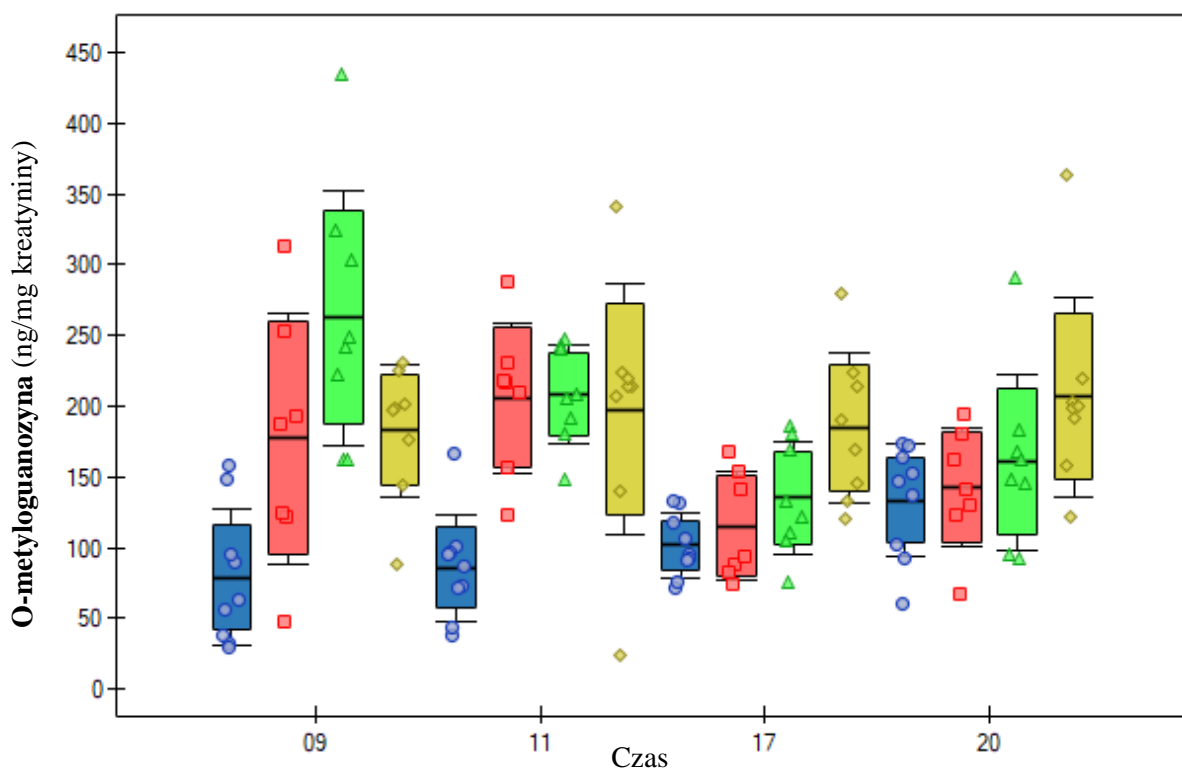
Wyniki badań analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **O-metyloguanozyny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 14 i na rycinie 23.

Tabela 14. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości O-metyloguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	78,89	47,96	15,99	a
	Makro	177,35	88,68	33,52	abcde
	Mikro	262,37	90,45	31,98	e
	Nano	182,72	46,88	16,58	bcde

11	Standard	86,02	37,71	12,57	ab
	Makro	205,96	53,17	20,10	de
	Mikro	208,08	34,55	12,21	de
	Nano	197,75	89,18	31,53	cde
17	Standard	101,48	22,51	7,50	abc
	Makro	114,87	38,46	14,54	abcd
	Mikro	135,30	39,66	14,02	abcd
	Nano	184,44	53,61	18,96	de
20	Standard	133,45	39,53	13,18	abcd
	Makro	142,83	42,17	15,94	abcd
	Mikro	160,64	62,12	21,96	abcd
	Nano	206,80	70,61	24,96	e
ANOVA	Efekt między grupowy			p<0,0001	
	Powtarzane pomiary			p=0,0043	
	Interakcja			p=0,0001	

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p>0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p<0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 23. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) stężenia O-metyloguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe ; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tydzień.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość O-metyloguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup różni się zarówno w zależności od zastosowanej suplementacji, jak i czasu pobierania próbek moczu do badań ($p < 0,05$). Wykazano, że zawartość O-metyloguanozyny była statystycznie istotnie wyższa w moczu zwierząt suplementowanych nanogenisteiną, w całym okresie badania (9, 11, 17 i 20 tygodniu), w odniesieniu do zawartości badanego biomarkera w moczu zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową, pozbawioną suplementacji. Podobną zależność stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych mikrogenisteiną, jednakże porównując próbki moczu uzyskane z 17 i 20 tygodnia nie były to wartości istotne statystycznie. W przypadku szczurów, które otrzymywały wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji), stężenie O-metyloguanozyny w moczu znacznie wzrosło w czasie (tydzień 9 \rightarrow 20) wraz z rozwojem nowotworu (wartość średnia \pm SD: $78,89 \pm 47,96$ vs $133,44 \pm 39,53$), jednakże ze względu na wysoką wartość odchylenia standardowego nie były to wartości istotne statystycznie.

Powyższej zależności nie stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych mikro i makrogenisteiną. W przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną, stężenie badanej metylowej pochodnej było bardzo wysokie od początku (9 tydzień) do końca obserwacji (20 tydzień) i zawsze wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 14, Rycina23).

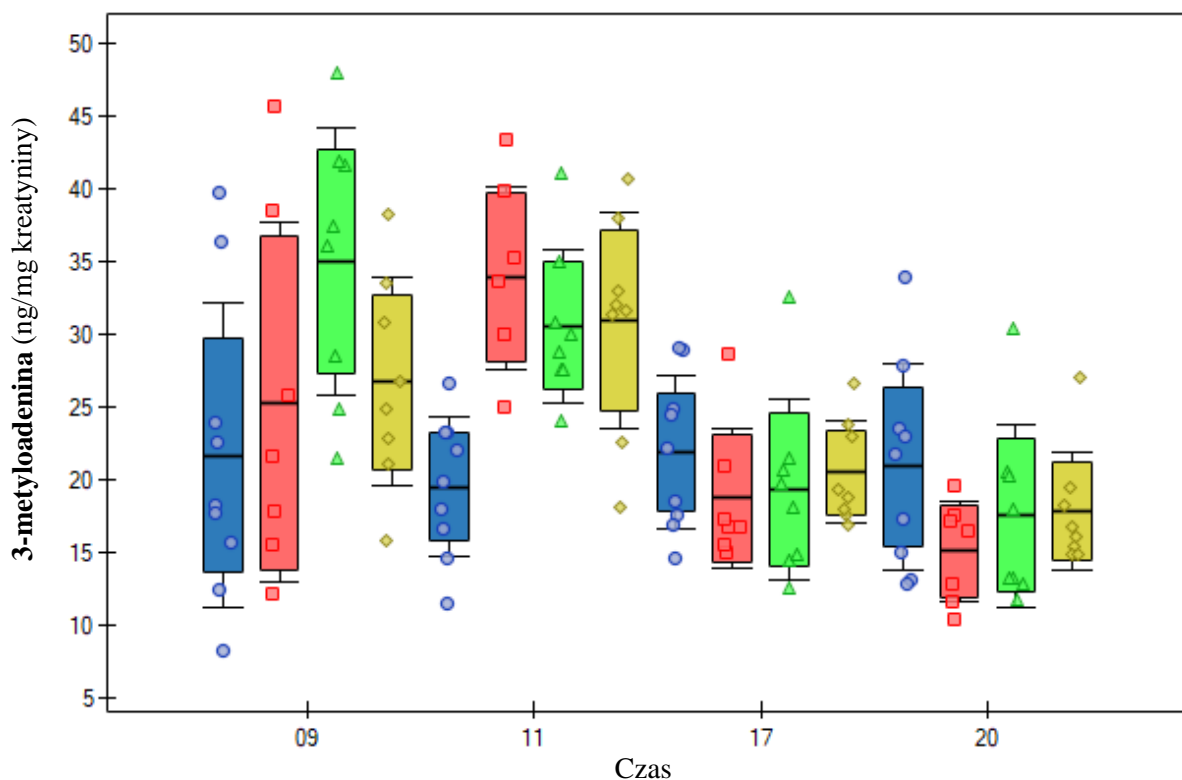
Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **3-metyloadeniny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 15 i na rycinie 24.

Tabela 15. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 3-metyloadeniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	21,66	10,46	3,49	ab
	Makro	25,34	12,41	4,69	abcd
	Mikro	35,02	9,22	3,26	d
	Nano	26,76	7,19	2,54	bcd
11	Standard	19,53	4,80	1,60	ab
	Makro	33,92	6,28	2,37	cd
	Mikro	30,61	5,26	1,86	cd
	Nano	30,93	7,43	2,63	bcd
17	Standard	21,91	5,31	1,77	abc
	Makro	18,73	4,75	1,80	ab
	Mikro	19,32	6,26	2,21	ab
	Nano	20,50	3,52	1,25	ab
	Standard	20,94	7,11	2,37	ab

20	Makro	15,11	3,44	1,30	a
	Mikro	17,56	6,27	2,22	a
	Nano	17,85	4,04	1,43	a
Efekt między grupowy				p=0,0873	
ANOVA	Powtarzane pomiary			p<0,0001	
	Interakcja			p=0,0004	

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednordne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 24. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 3-metyloadeniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe ; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tygodnie.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość 3-metyloadeniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup różniła się istotnie statystycznie w zależności od czasu pobierania próbek moczu do badań ($p < 0,05$). Wykazano, że zwierzęta suplementowane genisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością 3-metyloadeniny w moczu uzyskanym w 9 i 11 tygodniu życia zwierząt, w odniesieniu do zawartości badanego biomarkera w moczu zwierząt pozbawionych suplementacji. Istotny statystycznie spadek zawartości 3-metyloadeniny w moczu w czasie trwania eksperymentu (11-20 tydzień) stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych zarówno mikro, jak i nanogenisteiną (Tabela 15, rycina 24).

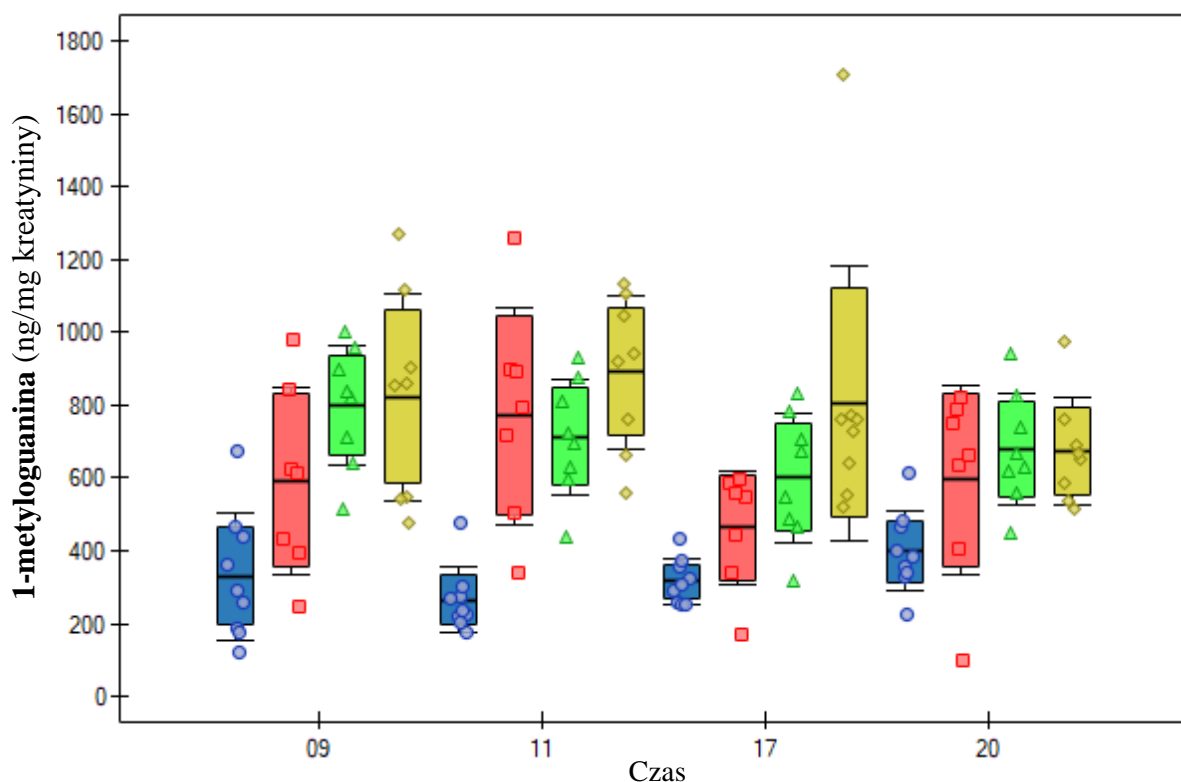
Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **1-metyloguaniny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 16 i na rycinie 25.

Tabela 16. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 1-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	330,33	174,62	58,21	ab
	Makro	591,62	257,20	97,21	cde
	Mikro	798,39	165,55	58,53	de
	Nano	822,55	284,72	100,66	de
11	Standard	264,72	89,31	29,77	a
	Makro	770,76	297,02	112,26	de
	Mikro	712,86	160,35	56,69	cde
	Nano	891,36	210,37	74,38	e
	Standard	315,43	61,92	20,64	a
	Makro	463,80	157,76	59,63	abcd

17	Mikro	600,73	176,25	62,31	bcde
	Nano	806,20	376,86	133,24	de
<hr/>					
20	Standard	399,36	109,94	36,65	abc
	Makro	594,89	258,58	97,73	bcde
	Mikro	678,73	155,14	54,85	bcde
	Nano	673,12	145,98	51,61	de
<hr/>					
		Efekt między grupowy		p<0,0001	
ANOVA	Powtarzane pomiary		p=0,0533		
		Interakcja		p=0,0410	

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 25. Wpływ nano, mikro i makro genisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 1-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe ; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makro genisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikro genisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nano genisteiną - żółte diamenty; Czas: tydzień.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotny statystycznie ($p < 0,0001$) wpływ suplementacji genisteiną (makro, mikro i nano) na zawartość 1-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA. Zwierzęta suplementowane genisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością 1-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu pozyskanym z 9 i 11 tygodnia życia zwierząt, w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej (pozbawionej suplementacji). Zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną cechowały się wyższą zawartością biomarkera w moczu uzyskanym z 17 tygodnia życia, w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Podobna zależność stwierdzono analizując zawartość 1-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu pochodzącym z 20. tygodnia życia szczurów suplementowanych nanogenisteiną (Rycina 25, Tabela 16).

Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **1-metyloadenozyny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 17 i na rycinie 26.

Tabela 17. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 1-metyloadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	28,44	19,38	6,46	a
	Makro	47,63	20,88	7,89	bcde
	Mikro	62,53	12,54	4,43	de
	Nano	37,43	11,62	4,11	abc
11	Standard	25,85	10,14	3,38	a
	Makro	69,43	14,79	5,59	e
	Mikro	55,83	6,64	2,35	cde
	Nano	55,13	9,24	3,27	cde
17	Standard	29,34	4,88	1,63	a
	Makro	43,82	8,37	3,16	bcd
	Mikro	42,35	11,26	3,98	bcd
	Nano	49,62	14,78	5,22	bcde
20	Standard	35,30	12,63	4,21	abc
	Makro	45,85	9,96	3,77	abcd
	Mikro	47,62	10,04	3,55	bcde
	Nano	49,48	13,66	4,83	bcde

Efekt między grupowy

$p < 0,0001$

ANOVA

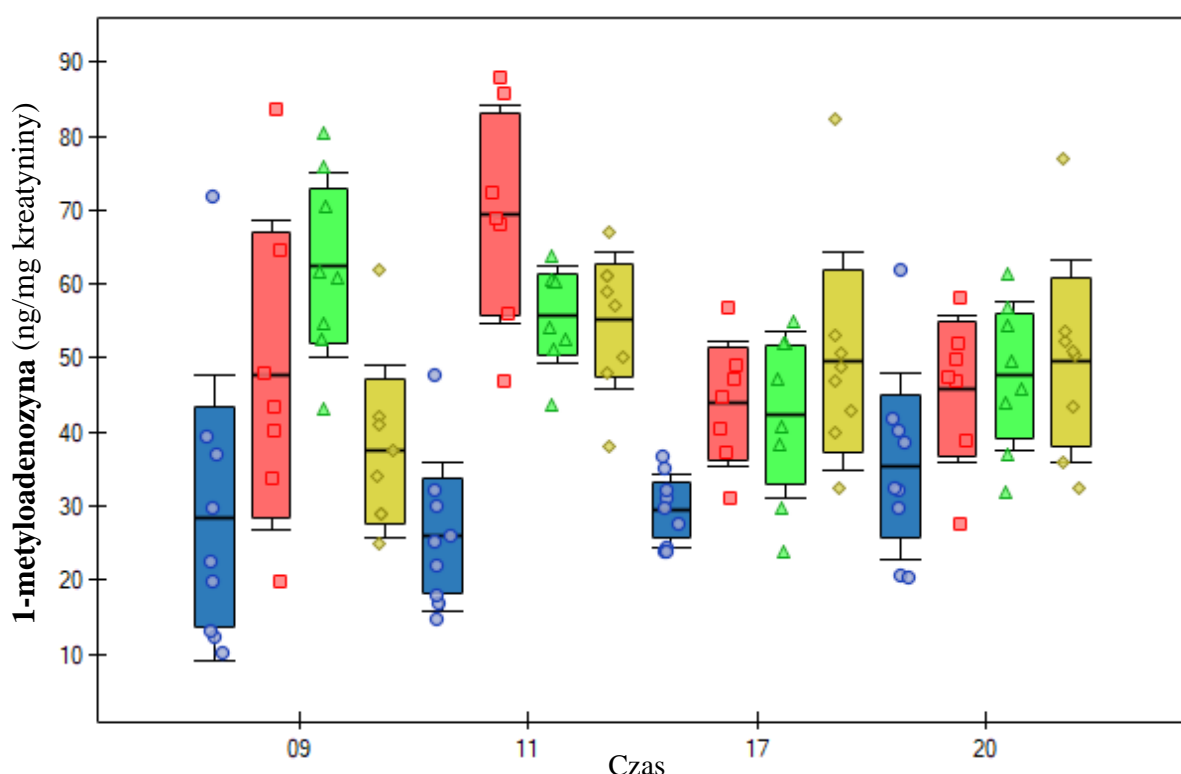
Powtarzane pomiary

p=0,0102

Interakcja

p=0,0005

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 26. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 1-metyloadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tygodnie.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość 1-metyloadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup różniła się istotnie statystycznie zarówno w zależności od rodzaju zastosowanej suplementacji, jak również czasu pobierania próbek moczu do badań ($p < 0,05$). Zwierzęta suplementowane genisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością 1-metyloadenozyny w moczu pochodzącym z 11 i 17

tygodnia, w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji. Podobną zależność stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych makro i mikrogenisteiną dla moczu uzyskanego z 9 tygodnia życia zwierząt. W moczu uzyskanym z 20 tygodnia zawartość badanego markera była wyższa w grupach zwierząt suplementowanych genisteiną, w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji, jednakże nie były to wartości istotne statystycznie. W przypadku szczurów, które otrzymywały wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji), stężenie 1-metyloadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu znacznie wzrosło w czasie (tydzień 9→20) wraz z rozwojem nowotworu (wartość średnia ± SD: 28,44±19,38 vs 35,30±12,63). Podobnej zależności nie wykazano w przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną. W grupach zwierząt suplementowanych makro i mikrogenisteiną stężenie badanego markera w moczu szczurów było bardzo wysokie w całym okresie badania (w moczu pozyskanym od 9 do 20 tygodnia życia zwierząt) (Tabela 17, Rycina 26).

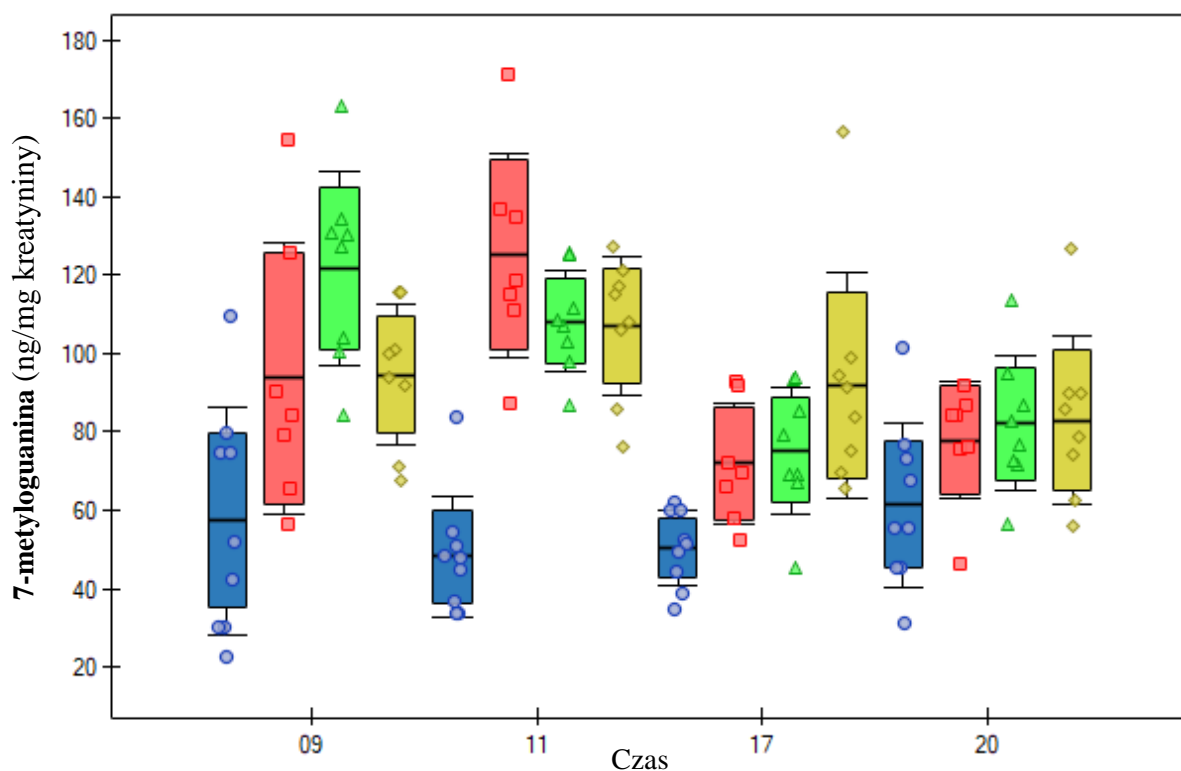
Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **7-metyloguaniny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 18 i na rycinie 27.

Tabela 18. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 7-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	57,32	29,00	9,67	ab
	Makro	93,68	34,72	13,12	bcde
	Mikro	121,68	24,58	8,69	e
	Nano	94,54	17,92	6,34	cde
11	Standard	48,30	15,35	5,12	a
	Makro	124,96	26,20	9,90	e
	Mikro	108,26	13,01	4,60	de

	Nano	107,12	17,67	6,25	de
	Standard	50,42	9,62	3,21	a
17	Makro	71,91	15,56	5,88	abcd
	Mikro	75,26	16,06	5,68	abcd
	Nano	91,81	28,62	10,12	bcde
	Standard	61,30	21,03	7,01	abc
20	Makro	77,95	15,05	5,69	abcd
	Mikro	82,01	17,19	6,08	abcd
	Nano	82,97	21,60	7,64	abcd
		Efekt między grupowy		p<0,0001	
ANOVA		Powtarzane pomiary		p<0,0001	
		Interakcja		p=0,0003	

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodnie grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p>0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p<0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 27. Wpływ nano, mikro i makro genisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 7-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe ; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makro genisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikro genisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nano genisteiną - żółte diamenty; Czas: tydzień.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość 7-metyloguaniny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup różniła się zarówno w zależności od zastosowanej suplementacji ($p < 0,0001$), jak i czasu pobierania próbek moczu do badań (efekt działania DMBA) ($p < 0,0001$). Stężenie badanego biomarkera w moczu pozyskanym z 9 i 11 tygodnia od szczurów pozbawionych suplementacji było istotnie statystycznie niższe, w porównaniu do zwierząt suplementowanych genisteiną w każdej postaci. Podobną zależność wykazano w przypadku zwierząt suplementowanych nano genisteiną dla moczu uzyskanego z 17 tygodnia życia zwierząt. W przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną, stężenie badanej metylowej pochodnej było bardzo wysokie od początku (9 tydzień) do końca obserwacji (20 tydzień) i zawsze wyższe w porównaniu do zawartości w moczu zwierząt z grupy kontrolnej (Tabela 18, Rycina 27).

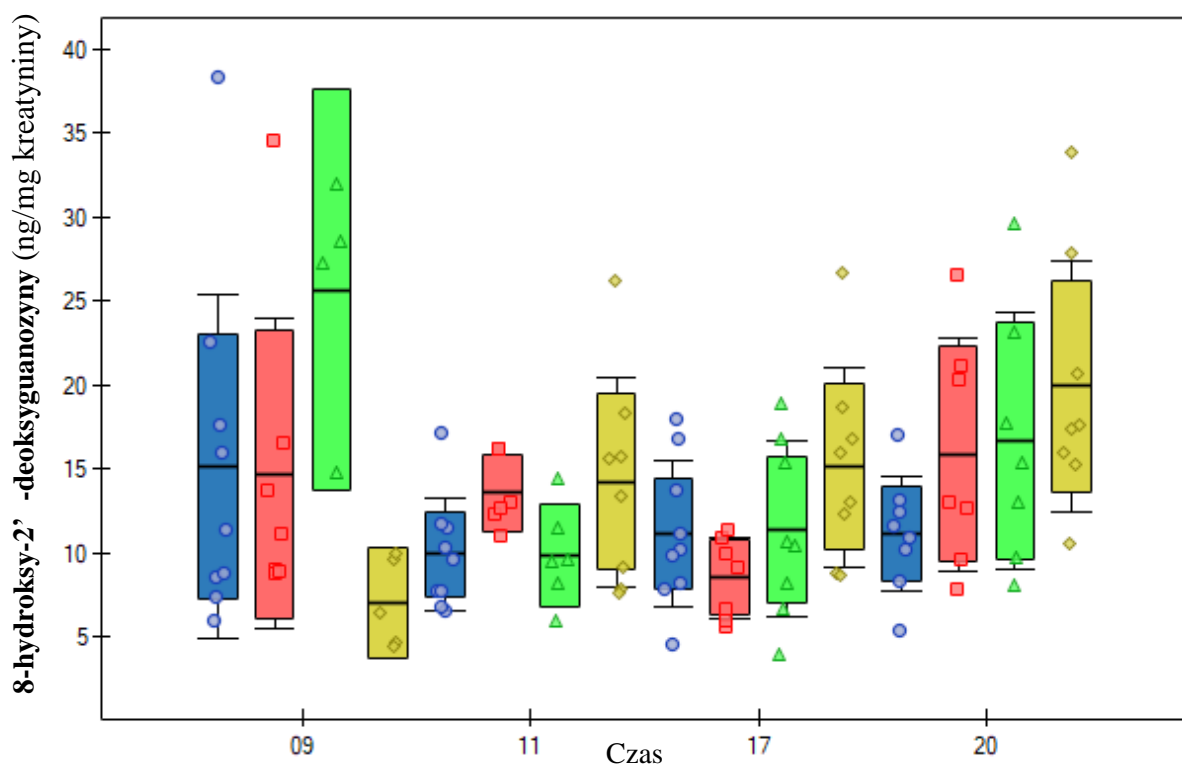
Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 19 i na rycinie 28.

Tabela 19. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	15,16	10,26	3,42	a
	Makro	14,67	9,23	3,49	a
	Mikro	25,62	7,49	3,74	a
	Nano	7,04	2,66	1,19	a
11	Standard	9,90	3,30	1,10	a
	Makro	13,56	2,14	0,88	a
	Mikro	9,86	2,87	1,17	a
	Nano	14,23	6,25	2,21	a
17	Standard	11,15	4,34	1,45	a
	Makro	8,52	2,41	0,91	a
	Mikro	11,39	5,22	1,85	a
	Nano	15,10	5,90	2,09	a
20	Standard	11,12	3,41	1,21	a
	Makro	15,87	6,91	2,61	a
	Mikro	16,66	7,62	2,88	a
	Nano	19,90	7,49	2,65	a

	Efekt między grupowy	p=0,3497
ANOVA	Powtarzane pomiary	p=0,3228
	Interakcja	p=0,0547

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 28. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tygodnie.

Na podstawie przeprowadzonych badań nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zawartości 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup zarówno w zależności od zastosowanej suplementacji, jak i czasu pobierania próbek do badań (działania DMBA) ($p < 0,05$) (Tabela 19, Rycina 28).

Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości **N6-metylo-2'-deoksyguanozyny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 20 i na rycinie 29.

Tabela 20. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości N6-metylo-2' deoksyadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	33,39	33,42	11,14	a
	Makro	97,65	43,76	16,54	bcd
	Mikro	110,04	60,13	21,26	c
	Nano	110,70	53,66	18,97	ef
11	Standard	26,78	23,67	7,89	ae
	Makro	155,85	74,94	28,32	f
	Mikro	54,05	38,39	13,57	abde
	Nano	59,83	28,95	10,24	abcdef
17	Standard	22,82	8,78	2,93	ae
	Makro	93,72	48,53	18,34	cd
	Mikro	48,92	15,48	5,47	abde
	Nano	55,20	28,33	10,02	abcde
20	Standard	26,01	9,53	3,18	ae
	Makro	57,41	19,07	9,54	abcde
	Mikro	29,35	9,17	4,10	abe
	Nano	7,33	2,05	1,45	abcd

Efekt między grupowy

p<0,0001

ANOVA

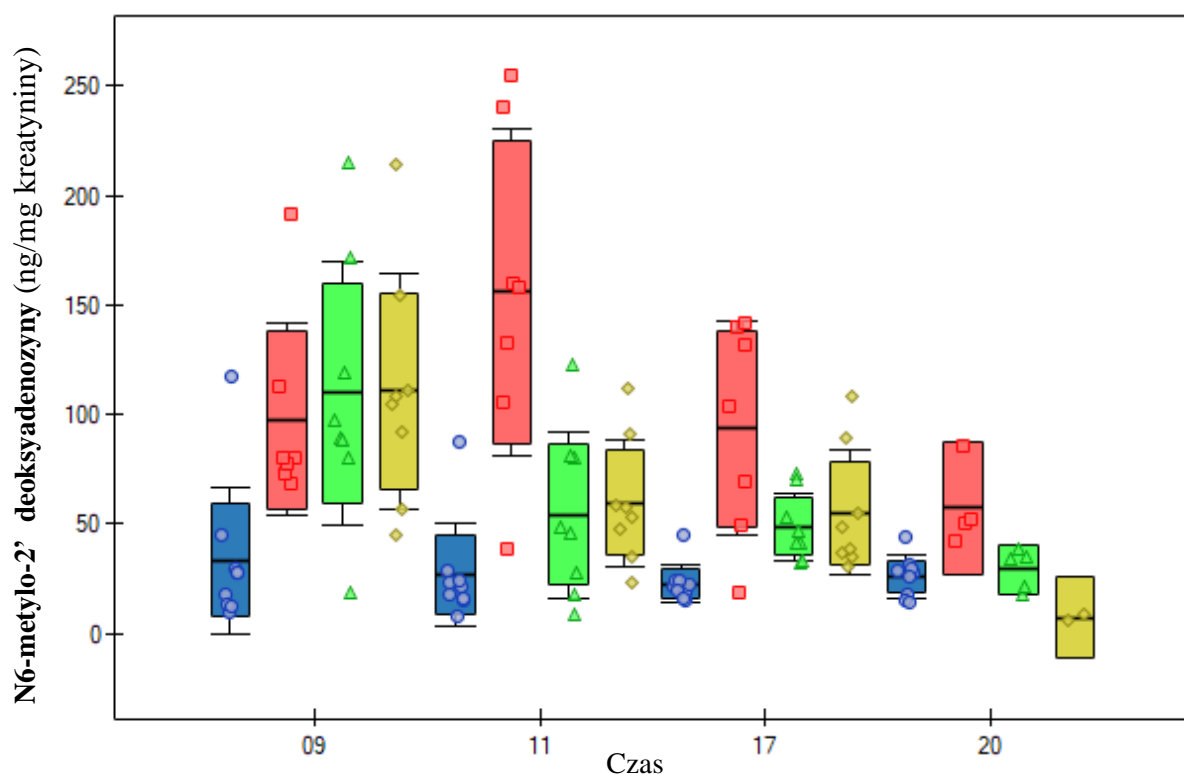
Powtarzane pomiary

p<0,0001

Interakcja

p<0,0001

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p>0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p<0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 29. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości N6-metylo-2'-deoksyadenozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tydzień.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość N6-metylo-2'-deoksyguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów z badanych grup różniła się zarówno w zależności od zastosowanej suplementacji ($p<0,0001$), jak i czasu pobierania próbek moczu do badań (efekt działania DMBA) ($p<0,0001$). W moczu uzyskanym w 9 tygodniu od szczurów pozbawionych suplementacji stężenie N6-metylo-2'-deoksyadenozyny (ng/mg kreatyniny) było

istotnie statystycznie niższe, niż u zwierząt suplementowanych genisteiną. Zwierzęta suplementowane makrogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartość badanego biomarkera w moczu pochodzącym z 11 i 17 tygodnia życia zwierząt, w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Podobną tendencję odnotowano dla szczurów suplementowanych mikro i nanogenisteiną (Rycina 29, Tabela 20).

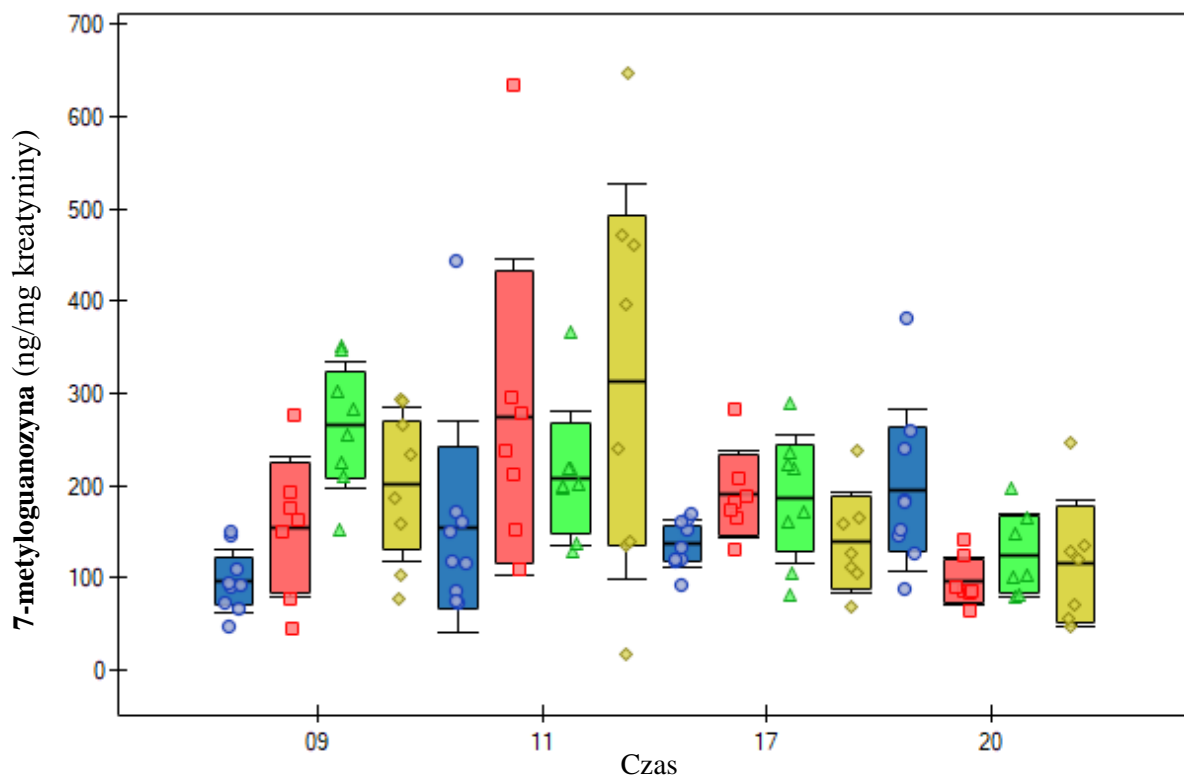
Wyniki analizy statystycznej wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartość **7-metyloguanozyny** (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA przedstawiono w tabeli 21 i na rycinie 30.

Tabela 21. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 7-metyloguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Tydzień	Grupa	Średnia arytmetyczna	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy średniej	Jednorodne grupy
09	Standard	96,44	34,30	11,43	a
	Makro	154,55	76,22	28,81	ab
	Mikro	265,55	68,91	24,36	b
	Nano	201,00	83,61	29,56	ab
11	Standard	154,52	114,48	38,16	ab
	Makro	273,90	172,08	65,04	b
	Mikro	208,02	72,50	25,63	ab
	Nano	313,38	213,93	75,64	ab
17	Standard	136,69	25,82	8,61	ab
	Makro	190,11	47,59	17,99	ab
	Mikro	185,83	69,55	24,59	ab
	Nano	138,48	54,14	20,46	ab
	Standard	195,19	87,63	29,21	b

	Makro	96,37	26,50	10,02	a
20	Mikro	124,72	45,45	17,18	ab
	Nano	115,05	68,46	25,87	ab
		Efekt między grupowy			p=0,1487
ANOVA	Powtarzane pomiary			p=0,0013	
		Interakcja			p=0,0017

Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną. Jednorodne grupy: taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$); ng: nanogram; mg: miligram.



Rycina 30. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na kinetykę zmian (9, 11, 17, 20 tydzień życia szczura) zawartości 7-metyloguanozyny (ng/mg kreatyniny) w moczu szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe ; Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji) - niebieskie kółka; Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną - czerwone kwadraty; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną - zielone trójkąty; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną - żółte diamenty; Czas: tydzień.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość 7-metyloguanozyny w moczu szczurów z badanych grup różniła się istotnie w zależności od czasu pobierania próbek do badań. Podobnej zależności nie stwierdzono w odniesieniu do zastosowanej suplementacji. Zawartość 7-metyloguanozyny była istotnie statystycznie niższa w moczu szczurów pozbawionych suplementacji, w odniesieniu do zwierząt suplementowanych mikrogenisteiną - dla moczu pochodzącego z 9 tygodnia i suplementowanych makrogenisteiną dla moczu uzyskanego w 11 tygodniu życia zwierząt. W przypadku zwierząt pozbawionych suplementacji wykazano istotny statystycznie wzrost zawartości badanego biomarkera w moczu wraz z rozwojem procesu nowotworowego - w okresie od 9 do 20 tygodnia życia zwierząt (Tabela 21, Rycina 30). Podobnej zależności nie stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną.

4. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA

Uzyskane wyniki badań wpływu suplementacji nano, mikro i makrogenisteiną na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość wybranych kwasów tłuszczowych ($\mu\text{g/ml}$) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA.

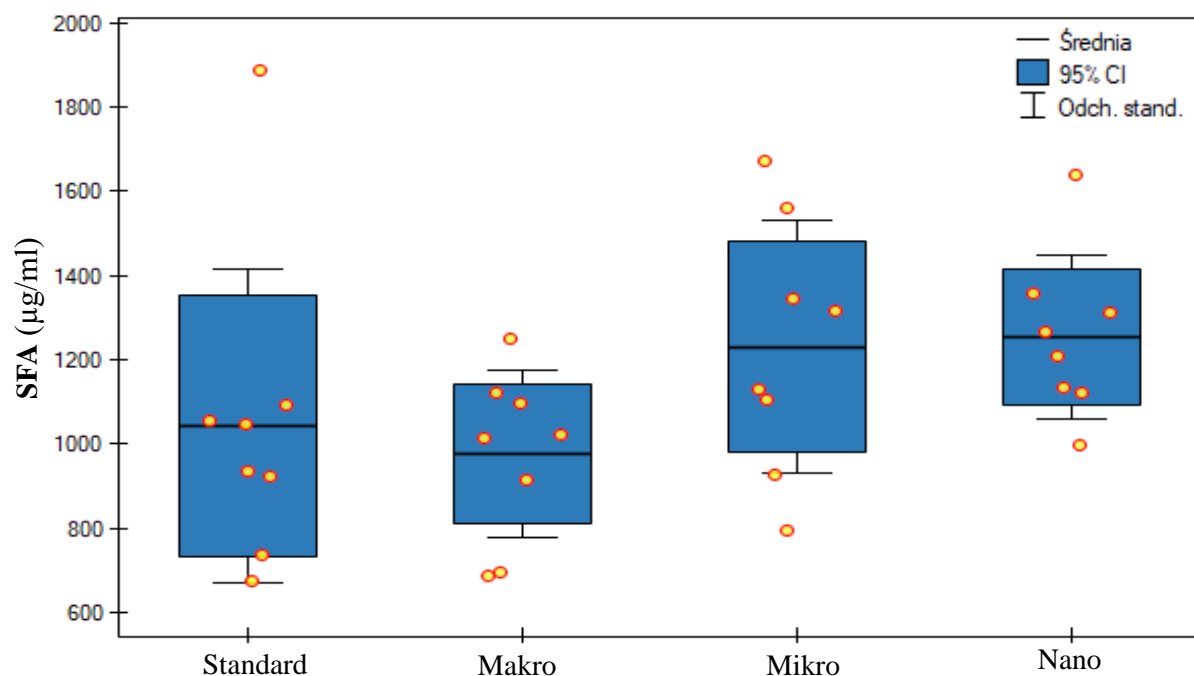
Rodzaj kwasu tłuszczowego	Grupa				P-value	
	Standard	Makro	Mikro	Nano		
SFA						
C12:0 Kwas laurynowy	12,57 \pm 8,52	13,53 \pm 3,43	16,24 \pm 3,69	14,69 \pm 5,27	n.s.	
C14:0 Kwas mirystynowy	24,64 \pm 25,68	18,28 \pm 4,55	24,73 \pm 3,82	26,85 \pm 5,17	n.s.	
C15:0 Kwas pentadekanowy	13,58 \pm 4,11 ^a	15,32 \pm 3,87 ^{ab}	20,39 \pm 5,09 ^{bc}	23,64 \pm 4,96 ^c	0,0004	
C16:0 Kwas palmitynowy	617 \pm 286	599 \pm 144	736 \pm 205	776 \pm 118	n.s.	
C17:0 Kwas heptadekanowy	16,55 \pm 3,55 ^a	17,55 \pm 2,81 ^{ab}	21,97 \pm 3,64 ^{bc}	23,55 \pm 4,60 ^c	0,0015	

C18:0 Kwas stearynowy	359±67	312±55	412± 4	389±71	n.s.
Σ SFA	1043±373	976±199	1231±299	1254±193	n.s.
<hr/>					
MUFA					
C16:1 n-7 Kwas palmitooleinowy	60,33±13,61 ^a	78,30±15,47 ^{ab}	102,31±12,99 ^b	98,13±34,12 ^b	0,0013
C16:1 n-9 Kwas cis-7-heksadekenowy	9,83±3,10 ^a	13,55±3,42 ^a	17,30±4,25 ^b	18,73±4,37 ^b	0,0003
C18:1 n-9 Kwas oleinowy	230±117	279±77	338±139	341±89	n.s.
C18:1 n-11 Kwas wakcenyowy	33,9 ±10,94 ^a	41,21±9,51 ^{ab}	53,65±17,28 ^b	57,91±14,79 ^b	0,0047
Σ MUFA	334±140	412±95	511±170	516±137	n.s.
<hr/>					
PUFA					
C18:2 n-6 LA	588±207 ^a	676±168 ^{ab}	854±241 ^{ab}	861±166 ^b	0,023
C18:3 n-6 GLA	18,55±5,07 ^a	22,97±6,08 ^{ab}	30,20±2,65 ^c	27,79 ±3,58 ^{bc}	0,0001
C18:3 n-3 ALA	46,69±15,30 ^{ab}	37,01±4,01 ^a	51,78± 9,05 ^b	53,91±10,26 ^b	0,015

C20:3 n-6 DGLA	6,30±3,28	7,08±2,25	7,49±2,07	5,71±1,96	n.s.
C20:4 n-6 AA	879±167 ^{ab}	824±168 ^a	1226±197 ^c	1114± 207 ^{bc}	0,0004
C20:5 n-3 EPA	54,67±24,89 ^b	31,17±7,81 ^a	45,72±10,28 ^{ab}	50,72±11,61 ^{ab}	0,024
C22:6 n-3 DHA	170±44,6 ^{ab}	149±30 ^a	218±2,5 ^b	202±36,3 ^{ab}	0,0116
∑ PUFA	1764±410^a	1748±348^a	2432±412^b	2314±399^b	0,0015

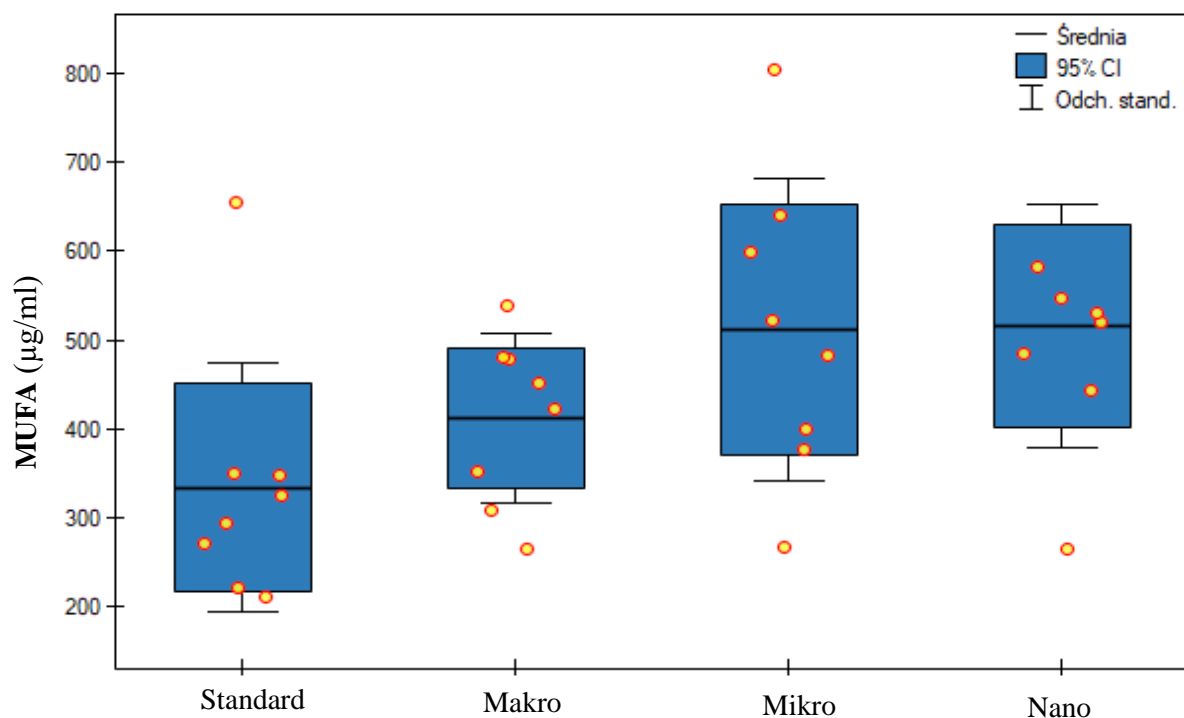
Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenerysteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenerysteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenerysteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$). Jednorodne grupy- taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$). SFA: nasycone kwasy tłuszczowe; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe; LA: kwas linolowy; GLA: kwas γ -linolenowy; ALA: kwas alfa-liponowy; DGLA: kwasu dihomog- γ -linolenowego; AA: kwas arachidonowy; EPA: kwas eikozapentaenowy; DHA: kwas dokozaheksaenowy; μ g: mikrogram; ml: mililitr.

Wpływ nano, mikro, makrogenisteiny na zawartość nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro, bądź nanogenisteiną przedstawiono na rycinach 31-33.



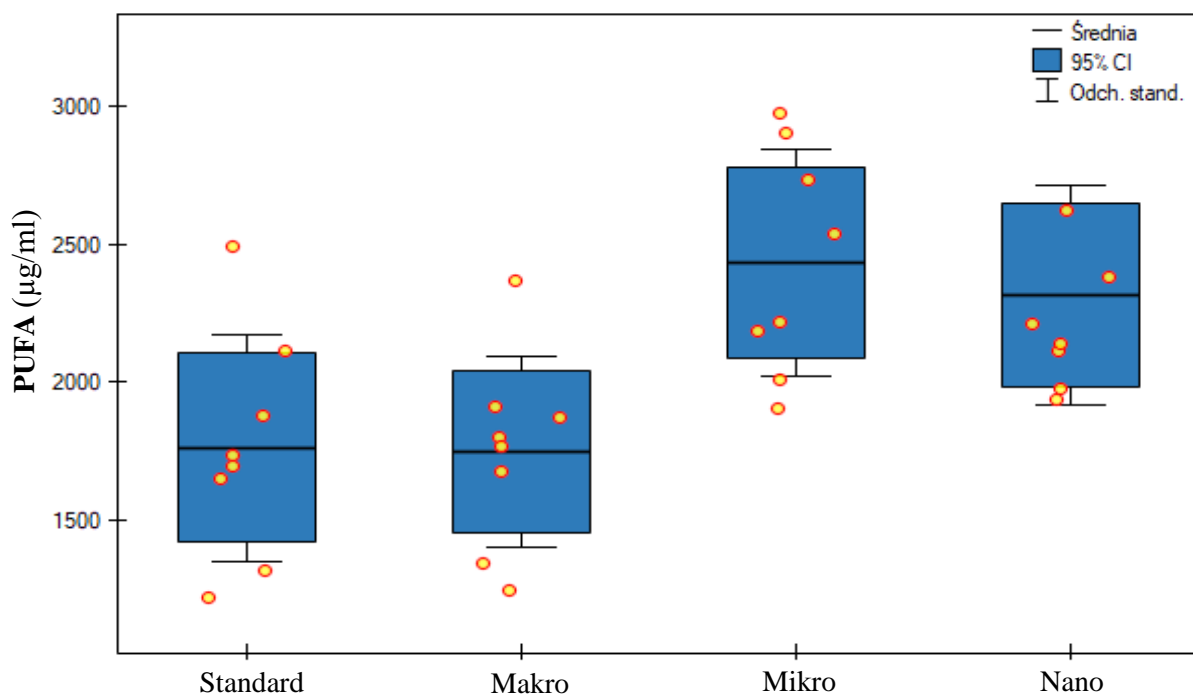
Rycina 31. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych ($\mu\text{g/ml}$) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; SFA: nasycone kwasy tłuszczowe; μg : mikrogram; ml: mililitr.



Rycina 32. Wpływ nano, mikro i makrofenisteiny na zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych ($\mu\text{g/ml}$) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrofenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrofenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanofenisteiną; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; μg : mikrogram; ml: mililitr.



Rycina 33. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ($\mu\text{g/ml}$) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe; μg : mikrogram; ml: mililitr.

W przeprowadzonym badaniu, w surowicy krwi szczurów, określono zawartość 17 kwasów tłuszczowych, w tym 6. kwasów nasyconych, 4. kwasów jednonienasyconych i 7. kwasów wielonienasyconych (Tabela 22). W największej ilości, w badanym materiale biologicznym, występowały kwasy: palmitynowy (C16:0) [w zakresie (wartość średnia \pm SD): 599 \pm 144 - 776 \pm 118]; stearynowy (C18:0) [w zakresie (wartość średnia \pm SD): 312 \pm 55 - 412 \pm 94]; oleinowy (C18:1 n-9) [w zakresie (wartość średnia \pm SD): 230 \pm 117 - 341 \pm 89] oraz kwas linolowy (C18:2, n-6) [w zakresie (wartość średnia \pm SD): 588 \pm 207 - 861 \pm 166]. Zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością kwasów: pentadekanowego, heptadekanowego (z puli kwasów nasyconych), palmitooleinowego, cis-7-heksadekenowy, wakcenenowy (z puli kwasów jednonienasyconych) oraz kwasów linolowego, gamma-linolenowego i arachidonowego (z puli kwasów wielonienasyconych) w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Zawartość kwasów: pentadekanowego, heptadekanowego, cis-7-heksadekenowy, alfa-linolenowego i arachidonowego była

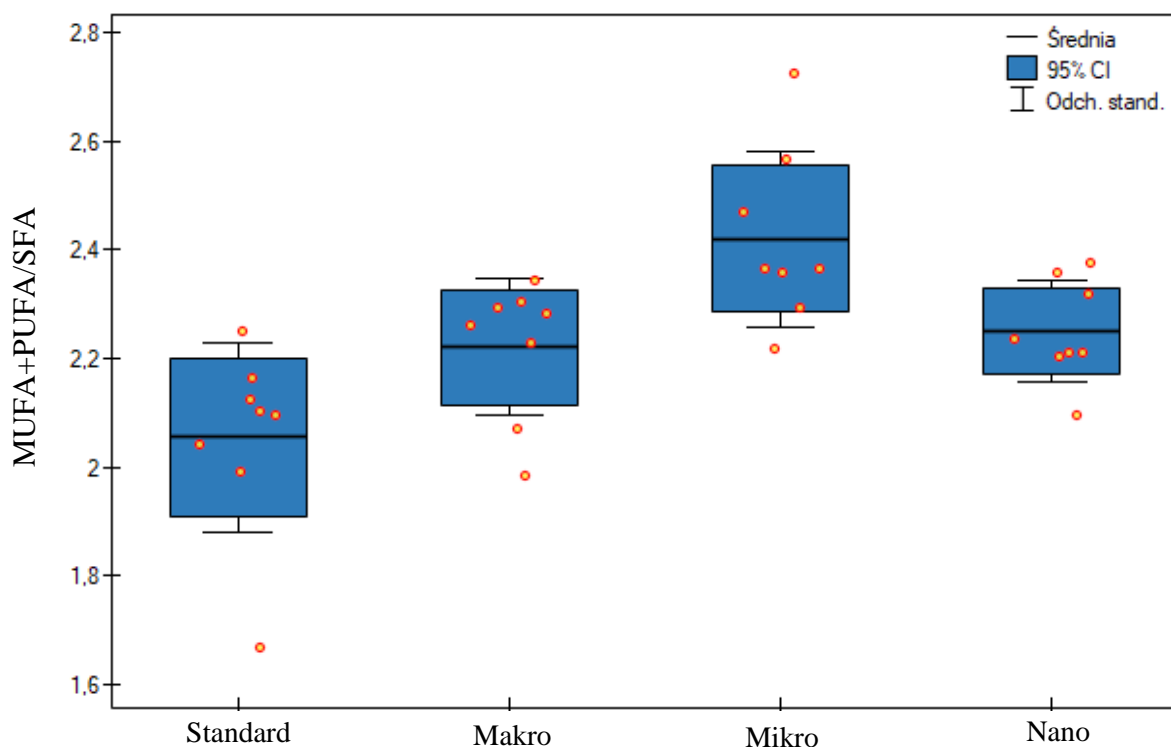
statystycznie istotnie niższa w surowicy krwi szczurów suplementowanych makrogenisteiną, w odniesieniu do ich zawartości w surowicy krwi szczurów suplementowanych nanogenisteiną. Wykazano istotnie statystycznie wyższą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (wartość sumaryczna) w surowicy krwi zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji), jak również suplementowanych makrogenisteiną (Rycina 33).

Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na stosunek profilu zawartości jednonienasyconych i wielonienasyconych do nienasyconych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego przedstawiono na rycinie 34 i 35 oraz tabela 23.

Tabela 23. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na profil zawartości kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów.

Profil kwasów tłuszczowych	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
(MUFA + PUFA)/SFA	2,05±0,17 ^a	2,22±0,13 ^{ab}	2,42±0,16 ^c	2,25±0,09 ^{bc}	0,0003
MUFA/PUFA	0,18±0,03 ^a	0,23±0,03 ^b	0,20±0,05 ^b	0,22±0,01 ^b	0,006

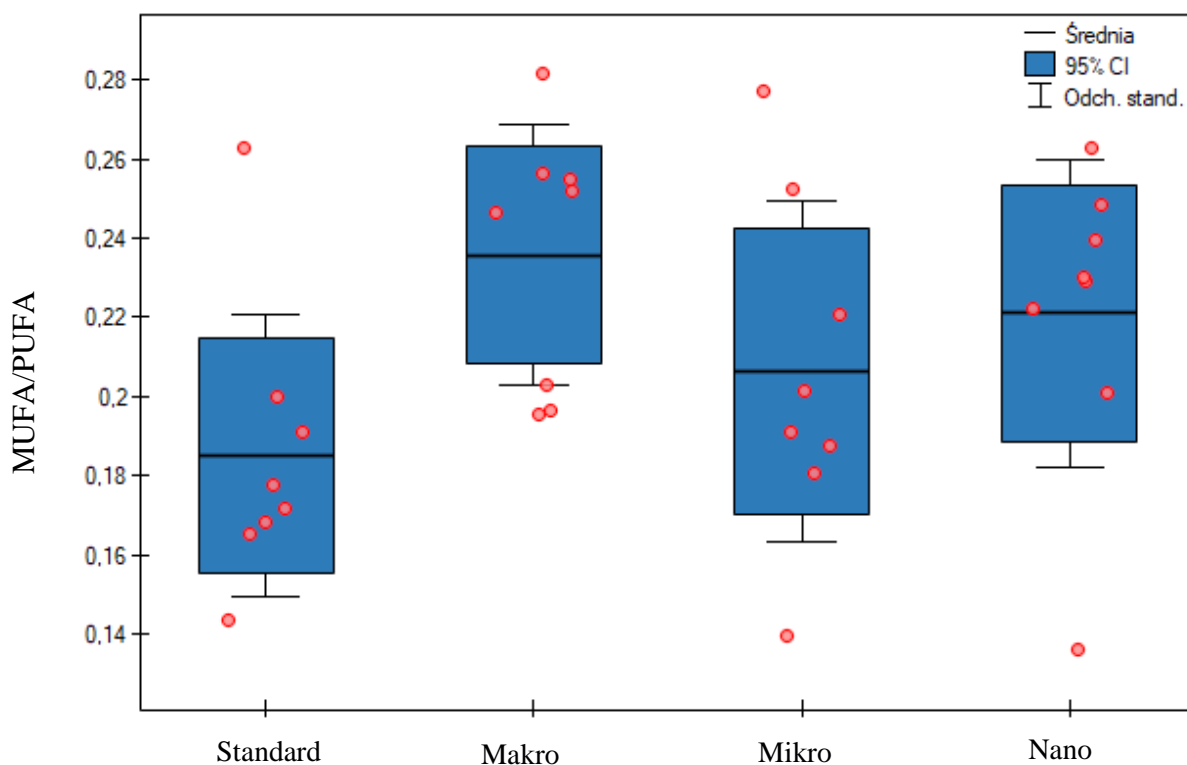
Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$). Jednorodne grupy- taka sama litera przy dwóch średnich oznacza brak istotnej różnicy między nimi ($p > 0,05$), jeśli przy dwóch porównywanych średnich żadna litera się nie powtarza to średnie te różnią się istotnie ($p < 0,05$). Σ : suma; /: iloraz; SFA: nasycone kwasy tłuszczowe; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe.



Rycina 34. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na stosunek kwasów tłuszczowych MUFA+PUFA/SFA w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe; SFA: nasycone kwasy tłuszczowe.

Stosunek kwasów MUFA+PUFA/SFA był istotnie statystycznie wyższy ($p=0,0003$) w surowicy krwi zwierząt suplementowanych genisteiną w formie mikro i nano, w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej (pozbawionej suplementacji).



Rycina 35. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na stosunek kwasów tłuszczowych MUFA/PUFA w surowicy szczurów traktowanych DMBA.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; MUFA: jednonienasycone kwasy tłuszczowe; PUFA: wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

Stosunek kwasów MUFA/PUFA był istotnie statystycznie wyższy ($p=0,0003$) w surowicy zwierząt suplementowanych genisteiną w formie makro, mikro i nano w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej (pozbawionej suplementacji).

5. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na aktywność enzymów szlaków metabolicznych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów

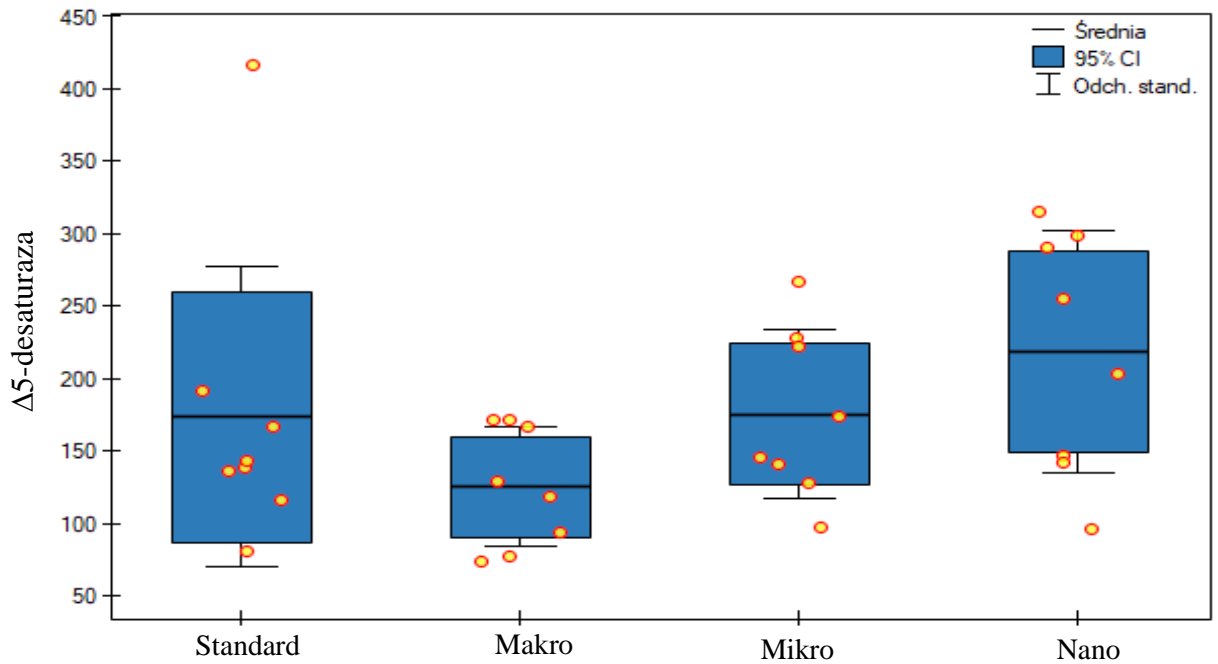
Uzyskane wyniki badań wpływu suplementacji nano, mikro i makrogenisteiną na aktywność wybranych enzymów szlaków metabolicznych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych w celu wywołania nowotworu sutka 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Aktywność $\Delta 6$ -destaurazy i $\Delta 5$ -desaturazy w surowicy zwierząt traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Desaturaza	D6D	P-value	D5D	P-value
Standard	$(33,06 \pm 8,22) * 10^{-3}$	n.s.	173,44 \pm 103,31	n.s.
Makro	$(35,73 \pm 12,19) * 10^{-3}$	n.s.	125,13 \pm 41,43	n.s.
Mikro	$(38,23 \pm 12,28) * 10^{-3}$	n.s.	175,19 \pm 58,42	n.s.
Nano	$(32,74 \pm 3,64) * 10^{-3}$	n.s.	218,14 \pm 83,35	n.s.

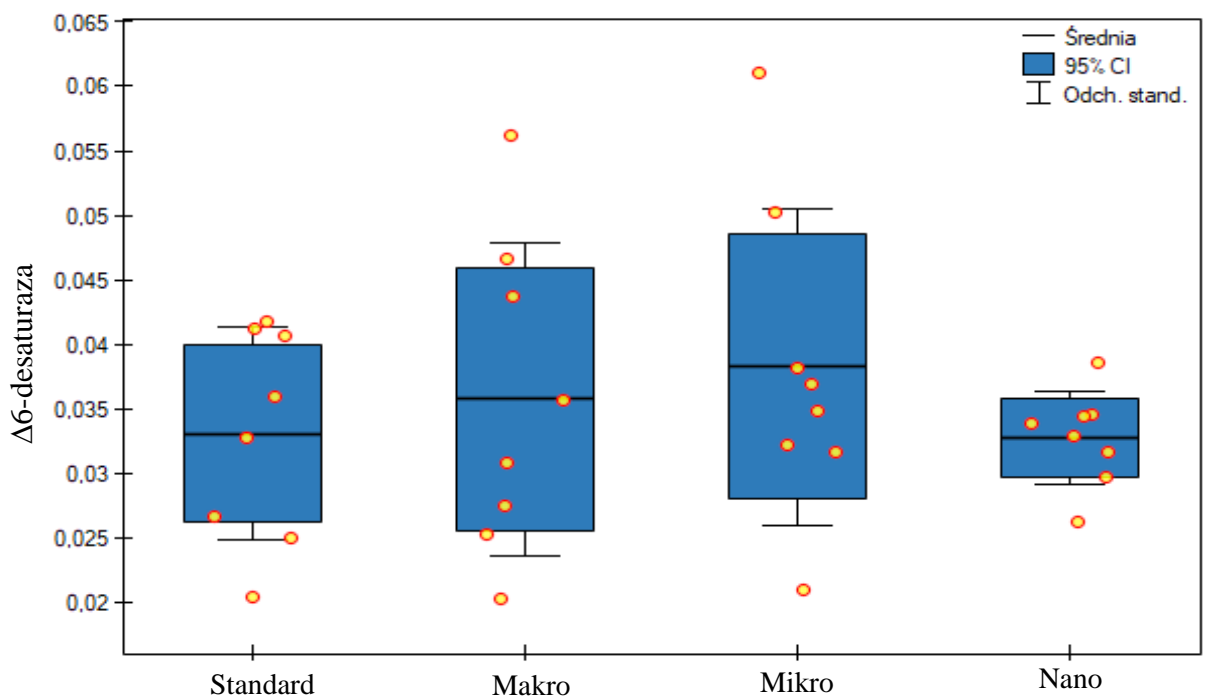
Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$); D6D - wskaźnik aktywności $\Delta 6$ -desaturazy, D5D - wskaźnik aktywności $\Delta 5$ -desaturazy.

Wpływ nano, mikro, makrogenisteiny na aktywność wybranych enzymów szlaków metabolicznych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego przedstawiono na rycinach 36-37.



Rycina 36. Aktywność $\Delta 5$ -desaturaza w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną.



Rycina 37. Aktywność $\Delta 6$ -desaturaza w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną

Na podstawie przeprowadzonych badań nie wykazano istotnych statystycznie zmian aktywności $\Delta 6$ -destaurazy, $\Delta 5$ -desaturazy w surowicy krwi szczurów. Najwyższą aktywnością $\Delta 6$ -destaurazy charakteryzowały się zwierzęta z grupy suplementowanej genisteiną w formie mikrocząstek w odniesieniu do pozostałych grup badawczych. Najniższą aktywność D6D (porównywalną z grupą kontrolną) i jednocześnie najwyższą aktywność D5D spośród wszystkich badanych grup stwierdzono w przypadku zwierząt suplementowanych nanogenisteiną. Wykazano niższą aktywność D5D w surowicy krwi zwierząt suplementowanych makrogenisteiną w odniesieniu do aktywności w/w enzymu w surowicy krwi szczurów otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji) (Tabela 17, Rycina 36, Rycina 37).

6. Aterogenność i trombogenność kwasów tłuszczowych zawartych w surowicy krwi szczurów suplementowanych nano, mikro i makrogenisteiną

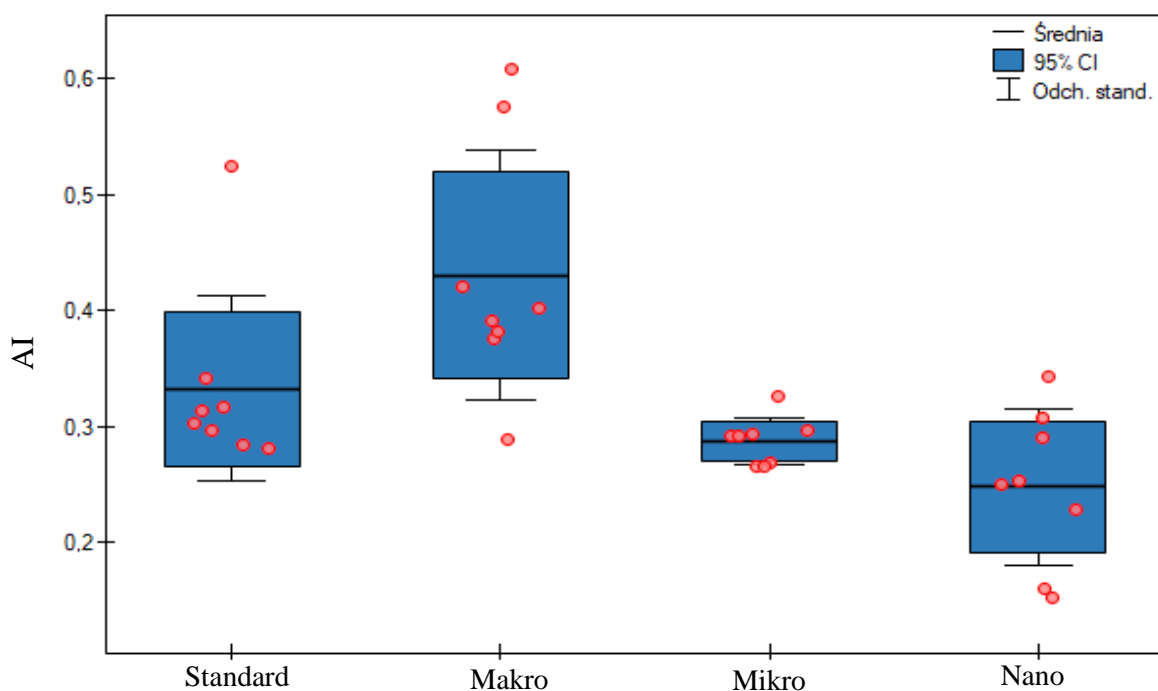
Uzyskane wyniki badań oceny wpływu suplementacji zwierząt makro, mikro i nanogenisteiną, w warunkach procesu nowotworowego, na wartości indeksu aterogenego (AI); indeksu trombogenego (TI) oraz proporcję kwasów hipocholesterolemicznych/hipercholesterolemicznych (h/H) w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego przedstawiono w tabeli 25 i na rycinach 38-40.

Tabela 25. Wpływ suplementacji zwierząt makro, mikro i nanogenisteiną na wartości indeksu aterogenego, indeksu trombogenego oraz proporcję kwasów hipocholesterolemicznych/hipercholesterolemicznych w surowicy krwi szczurów.

Parametr	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
AI	0,33 \pm 0,03 ^{ab}	0,43 \pm 0,04 ^b	0,29 \pm 0,01 ^a	0,25 \pm 0,02 ^a	p= 0,0003

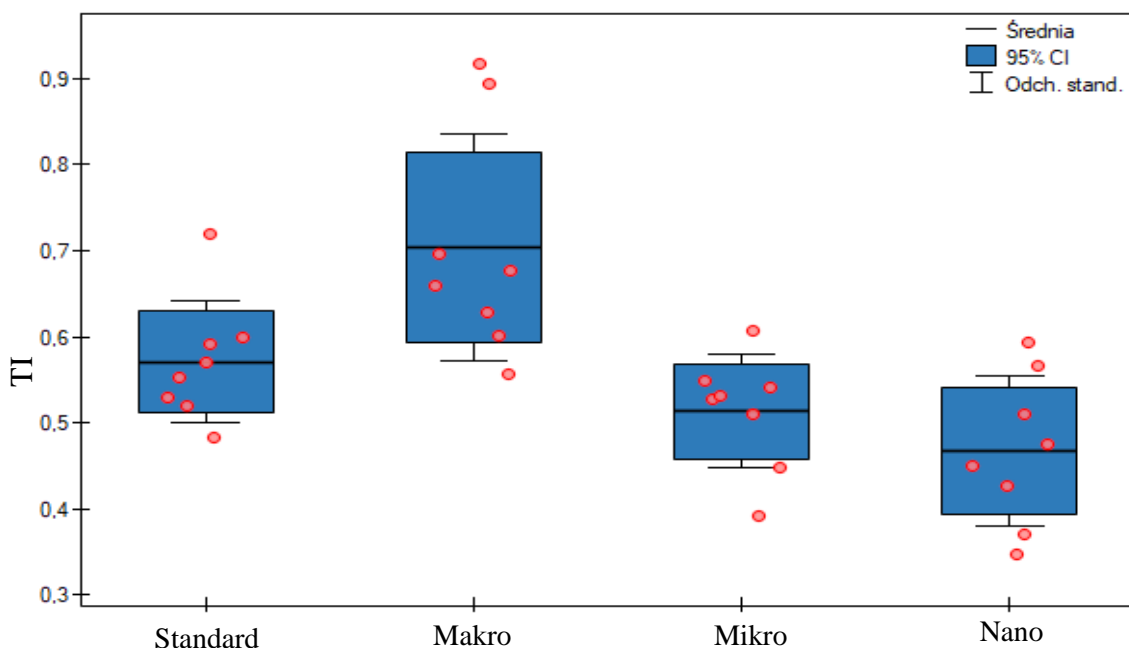
TI	0,57±0,02 ^a	0,70±0,05 ^b	0,51±0,02 ^a	0,47±0,03 ^a	p=0,0001
h/H	3,28±0,18	3,21±0,1	3,68±0,12	3,42±0,16	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$); a,b - grupy jednorodne w rzędach ($\alpha = 0,05$); AI - indeks aterogeny; TI - indeks trombogeny; h/H - stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych.



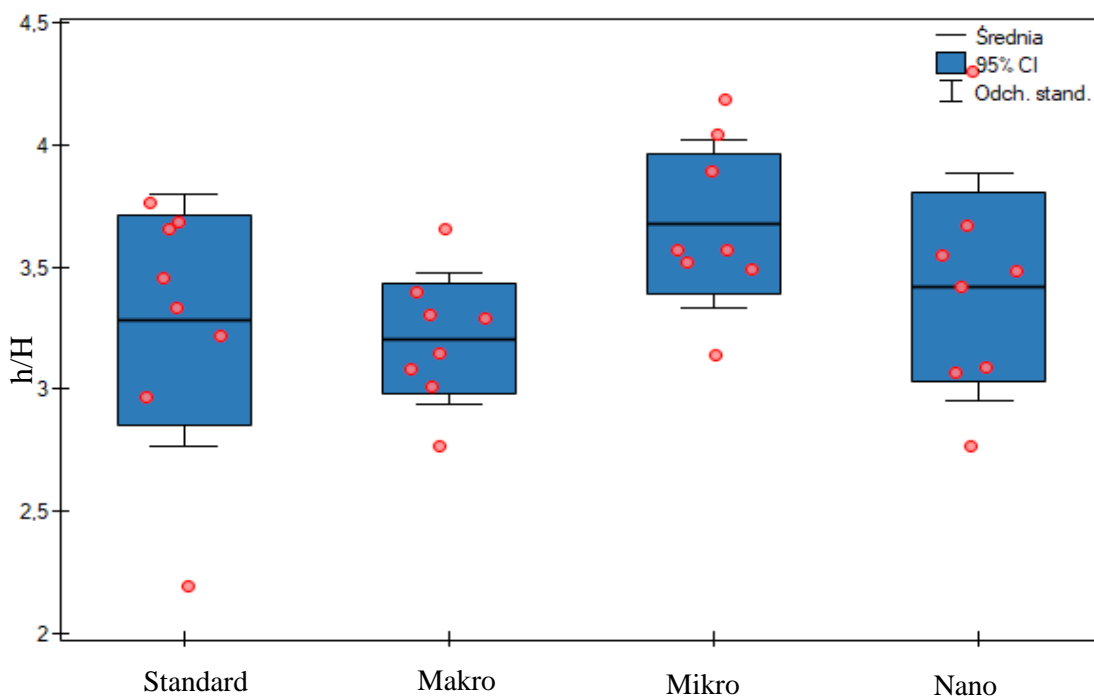
Rycina 38. Wartość indeksu aterogenego (AI) surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem kancerogennym i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; AI - indeks aterogeny.



Rycina 39. Wartość indeksu trombogenicnego (TI) surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem nowotworczym i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; TI - indeks trombogenicny.



Rycina 40. Wyniki badań zawartości kwasów hipocholesterolemicznych/ hipercholesterolemicznych (h/H) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) w surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem nowotworczym i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; h/H - stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że zwierzęta suplementowane makrogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie ($p=0,0003$) wyższą wartością indeksu aterogenego (wartość średnia \pm SD: $0,43\pm 0,04$), w porównaniu do zwierząt suplementowanych mikro (wartość średnia \pm SD: $0,29\pm 0,01$), jak również nanogenisteiną (wartość średnia \pm SD: $0,25\pm 0,02$). Zwierzęta suplementowane makrogenisteiną wyróżniły się statystycznie istotnie wyższą wartością indeksu trombogenicznego ($p=0,0001$) w porównaniu do pozostałych grup zwierząt. W proporcji pomiędzy kwasami hipocholesterolemicznymi i hipercholesterolemicznymi nie wykazano istotnie statystycznych różnic w surowicy krwi z badanych grup.

7. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość wybranych metabolitów kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA

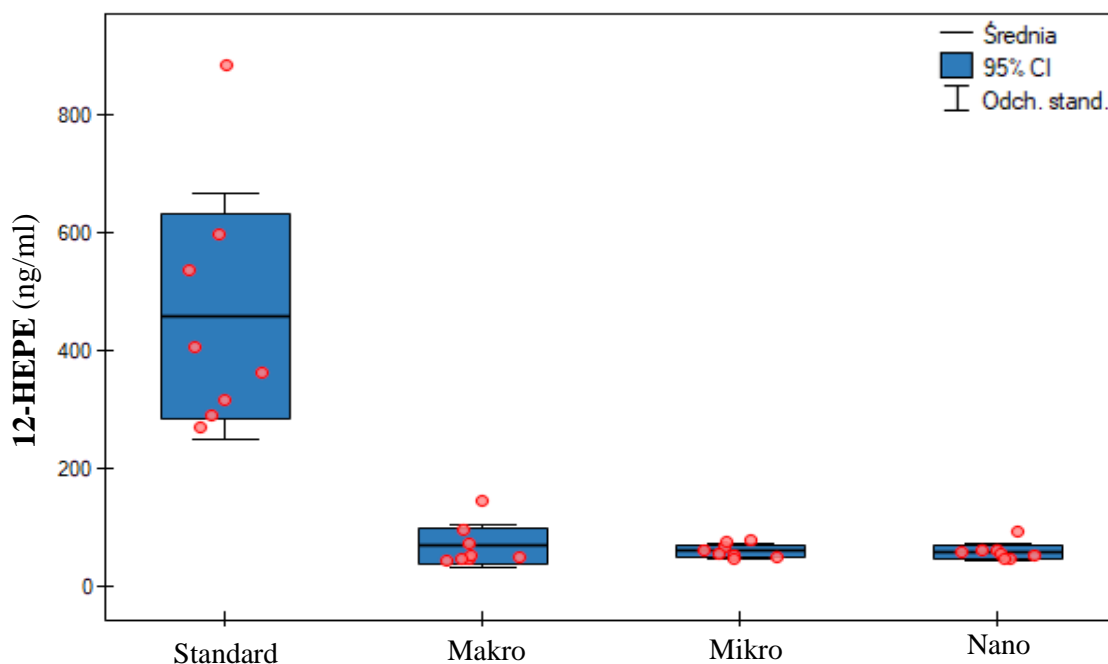
Wyniki badań zawartości kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowego, kwasu-12-hydroksyeikozapentaenowego oraz kwasów hydroksyoktadekadienowych (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem kancerogennym DMBA oraz suplementowanych makro mikro bądź nanogenisteiną przedstawiono w tabeli 26 oraz na rycinach 41-45.

Tabela 26. Zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowego, kwasu-12-hydroksyeikozapentaenowego oraz sumy kwasów hydroksyoktadekadienowych (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem kancerogennym oraz suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Eikozanoidy	Grupa				
	Standard	Makro	Mikro	Nano	P-value
12-HEPE	458,19 \pm 208,09 ^b	69,45 \pm 36,42 ^a	61,07 \pm 12,68 ^a	60,21 \pm 14,18 ^a	0,0013

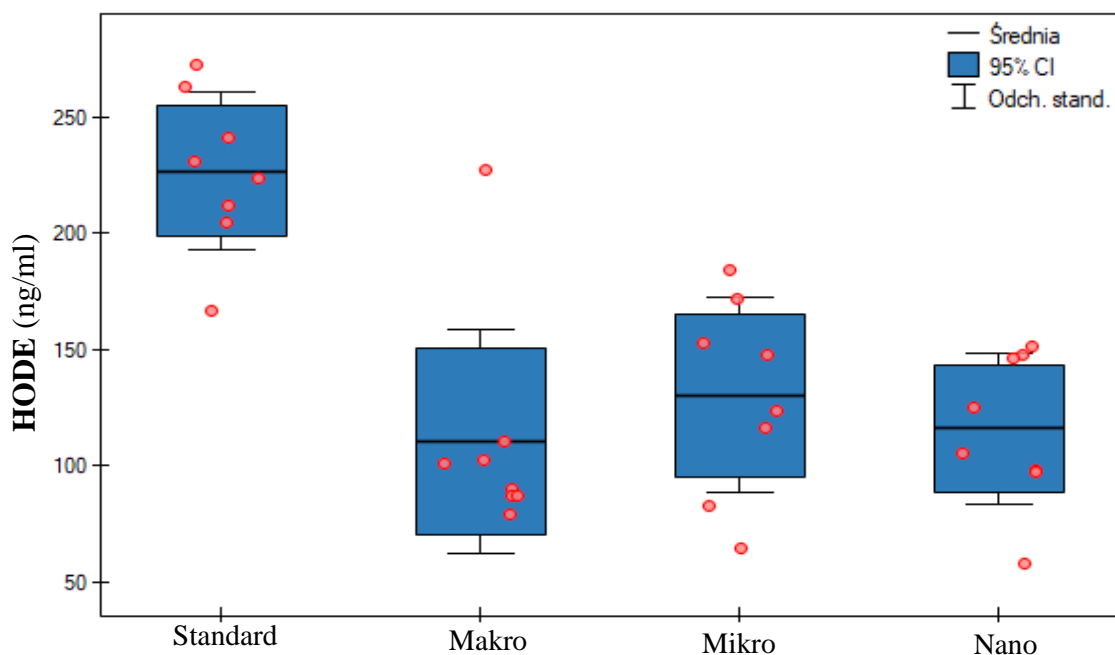
HODE	226,82±33,67 ^b	110,60±48,13 ^a	130,52±41,90 ^a	116,13±32,58 ^a	0,0001
15-HETE	43,10±7,58 ^b	29,06±6,49 ^a	36,82±14,09 ^{ab}	36,18±8,68 ^{ab}	n.s.
12-HETE	6446±1522 ^b	2414±917 ^a	1918±219 ^a	1897±319 ^a	0,0001
5-HETE	10,94±2,81	6,84±3,64	9,29±6,25	15,73±14,17	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$); a,b - grupy jednorodne w rzędach ($\alpha = 0,05$), n.s. -różnice nieistotne statystycznie; 12-HEPE - kwas 12-hydroksyeikozapentaenowy; HODE - suma kwasów hydroksyoktadekadienowych; 15-HETE - kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy; 12-HETE - kwas 12-hydroksyeikozatetraenowy; 5-HETE - kwas 5 - hydroksyeikozatetraenowy; ng: nanogram; ml: mililitr.



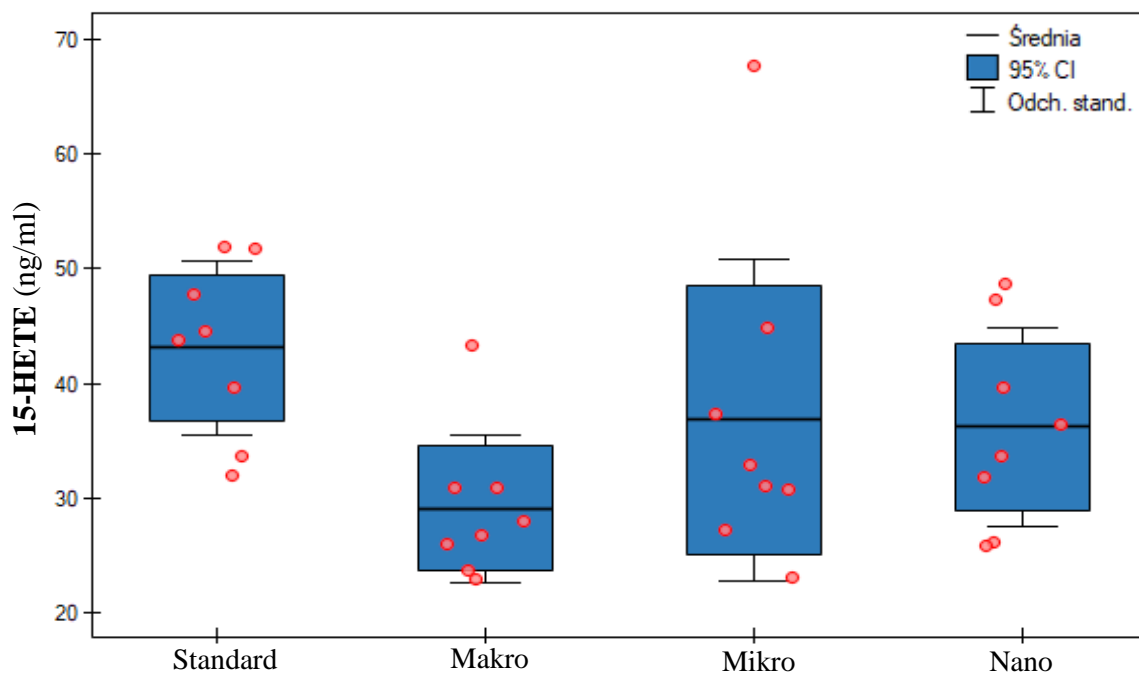
Rycina 41. Zawartość kwasu 12-hydroksyeikozapentaenowego (12-HEPE) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; 12-HEPE: kwas 12-hydroksyeikozapentaenowy; ng: nanogram; ml: mililitr.



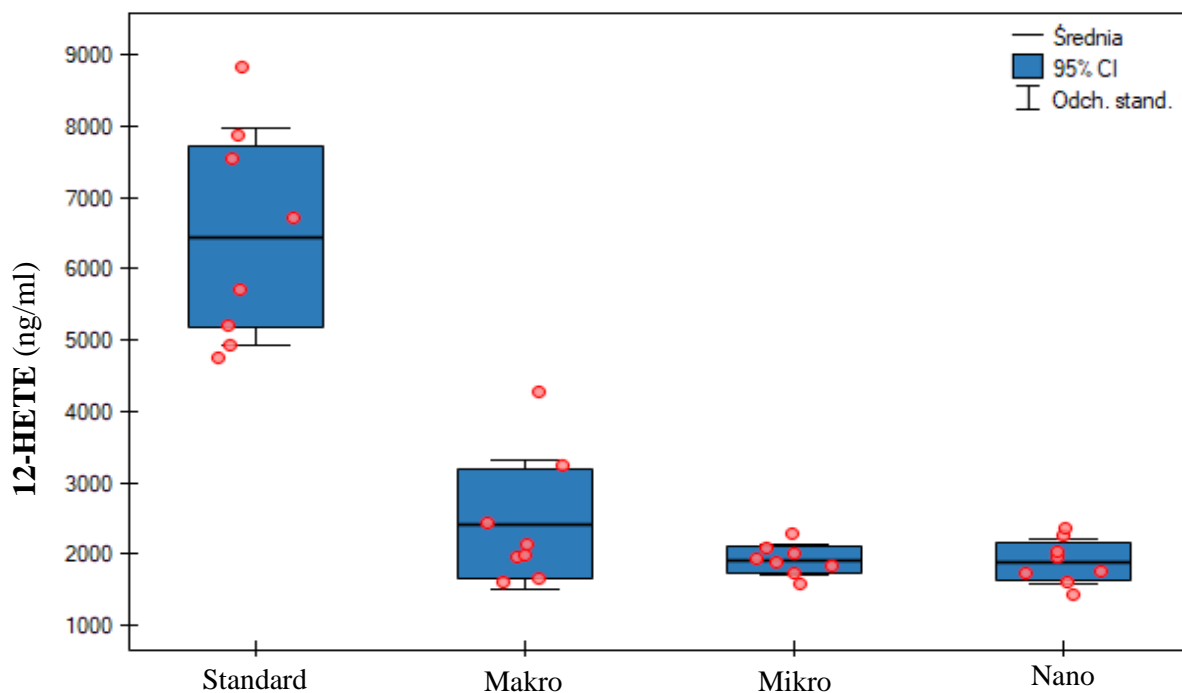
Rycina 42. Zawartość sumy kwasów hydroksyoctadekadienowych (HODE) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; HODE: hydroksyoctadekadienowych; ng: nanogram; ml: mililitr.



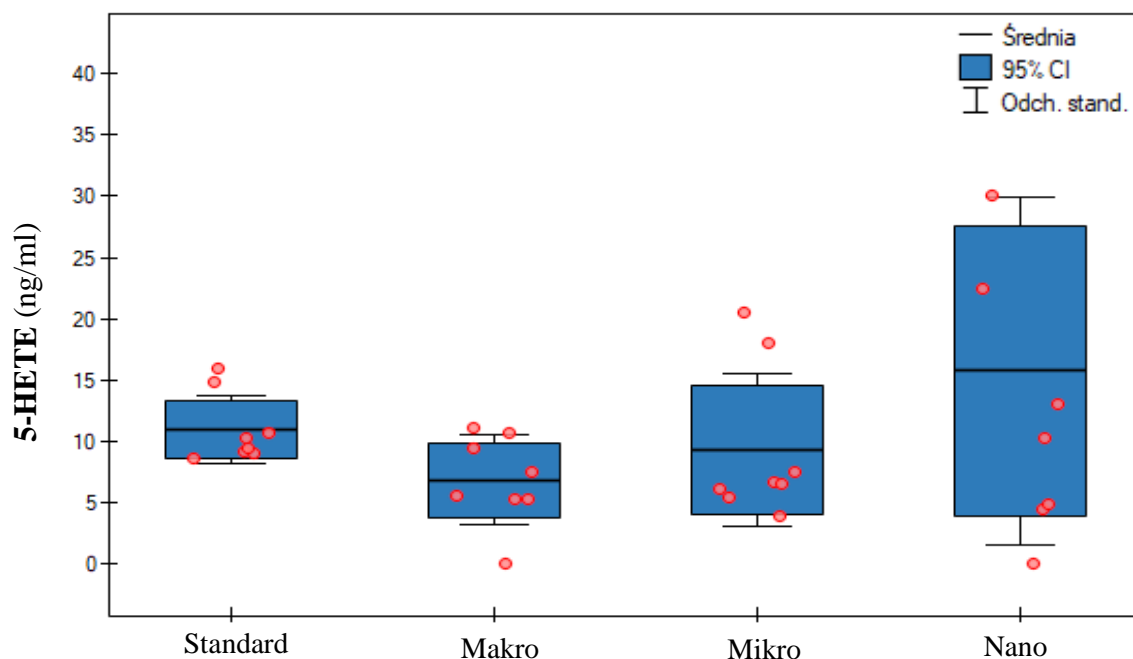
Rycina 43. Zawartość kwasu 15-hydroksyeikozatetraenowego (15-HETE) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; 15-HETE: kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy; ng: nanogram; ml: mililitr.



Rycina 44. Zawartość kwasu 12-hydroksyeikozatetraenowego (12-HETE) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; 12-HETE: kwas 12-hydroksyeikozatetraenowy; ng: nanogram; ml: mililitr.



Rycina 45. Zawartość kwasu 5-hydroksyeikozatetraenowego (5-HETE) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; 5-HETE: kwas 5-hydroksyeikozatetraenowy; ng: nanogram; ml: mililitr.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotnie statystycznie niższą zawartość 12-HEPE ($p=0,001$); HODE ($p=0,0001$) oraz 12-HETE ($p=0,0001$) w surowicy szczurów suplementowanych genisteiną w postaci makro, mikro i nano, w odniesieniu do zawartości w/w markerów w surowicy krwi szczurów otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zawartości kwasów 5-HETE oraz 15-HETE w surowicy krwi szczurów w zależności od zastosowanej suplementacji (Tabela 26, Ryciny 41-45).

8. Wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość interleukiny 1, interleukiny 6, metaloproteiny 9 w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA

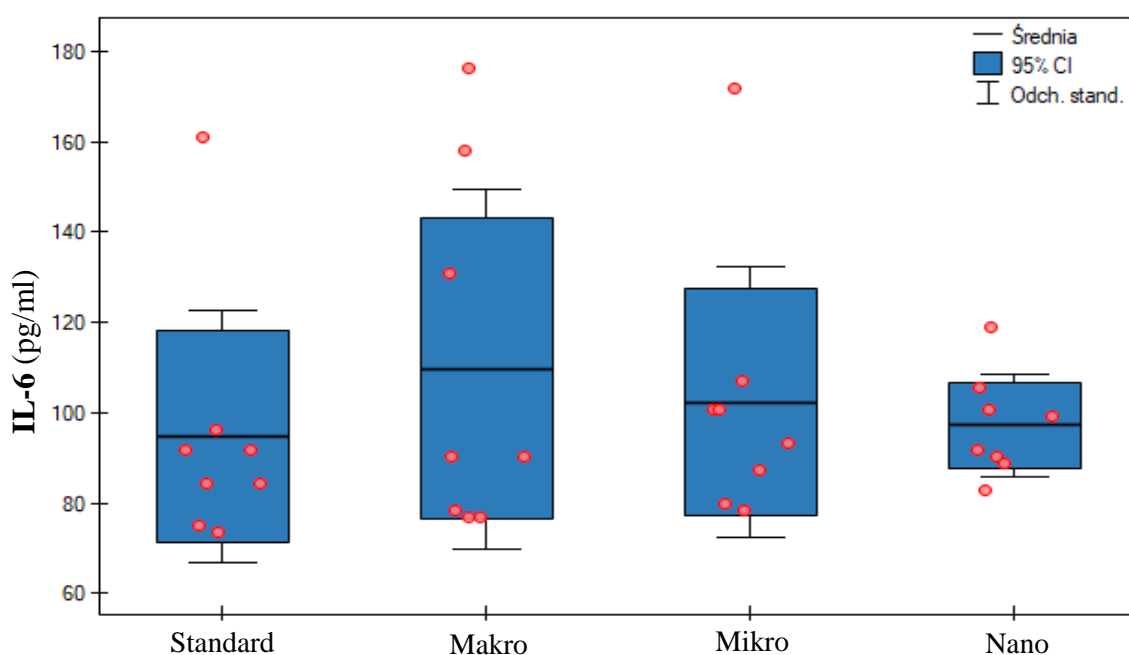
Wyniki badań zawartości interleukiny 1, interleukiny 6 oraz metaloproteiny 9 w surowicy krwi zwierząt traktowanych czynnikiem kancerogennym (DMBA) i

suplementowanych odpowiednio nano, mikro bądź makrogenisteiną przedstawiono w tabeli 27 i na rycinach 46-48.

Tabela 27. Stężenie interleukiny 6 (IL-6) (pg/ml), interleukiny 1 (IL-1) (pg/ml) oraz metaloproteiny 9 (MMP-9) (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA oraz suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

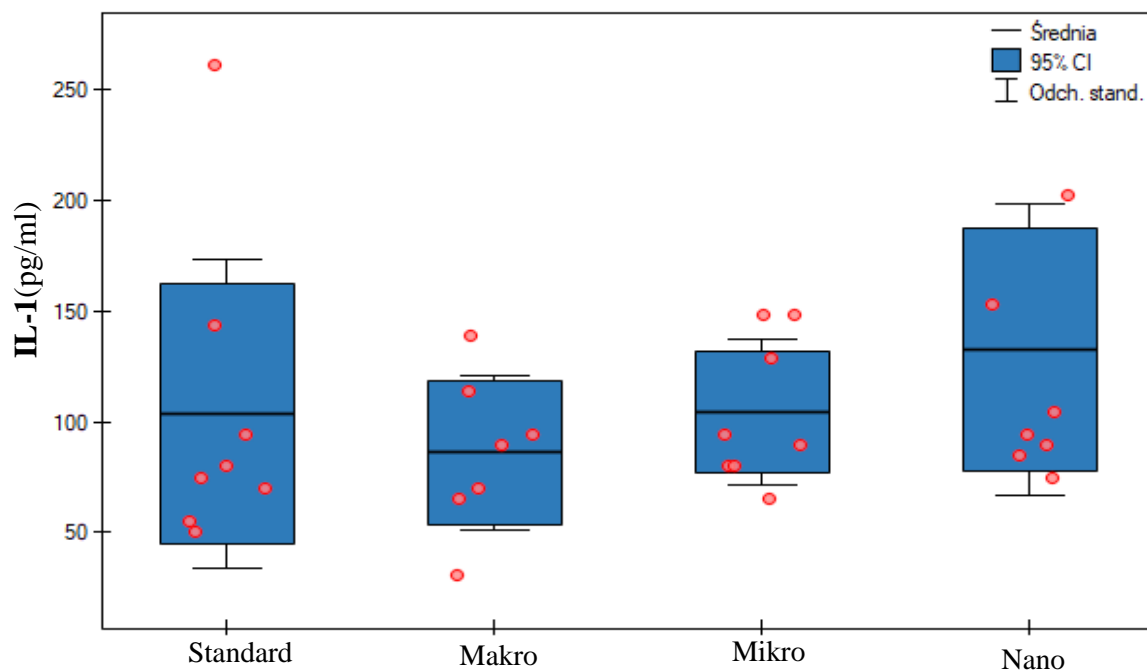
	Grupa				P-value
	Standard	Makro	Mikro	Nano	
IL-6	88,47±40,39	109,97±57,64	99,36±43,12	92,01±16,50	n.s.
IL-1	103,64±69,86	86,05±35,07	104,25±32,82	132,43±65,78	n.s.
MMP-9	0,64±0,35	1,67±1,10	1,80±1,05	2,03±2,68	n.s.

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; P-value: prawdopodobieństwo testowe (istotność statystyczna); n.s., różnice nieistotne statystycznie ($\alpha = 0,05$); IL-6 - interleukina 6; IL-1 - interleukina 1, MMP-9 - metaloproteinaza 9; pg: pikogram; ml: mililitr; ng: nanogram.



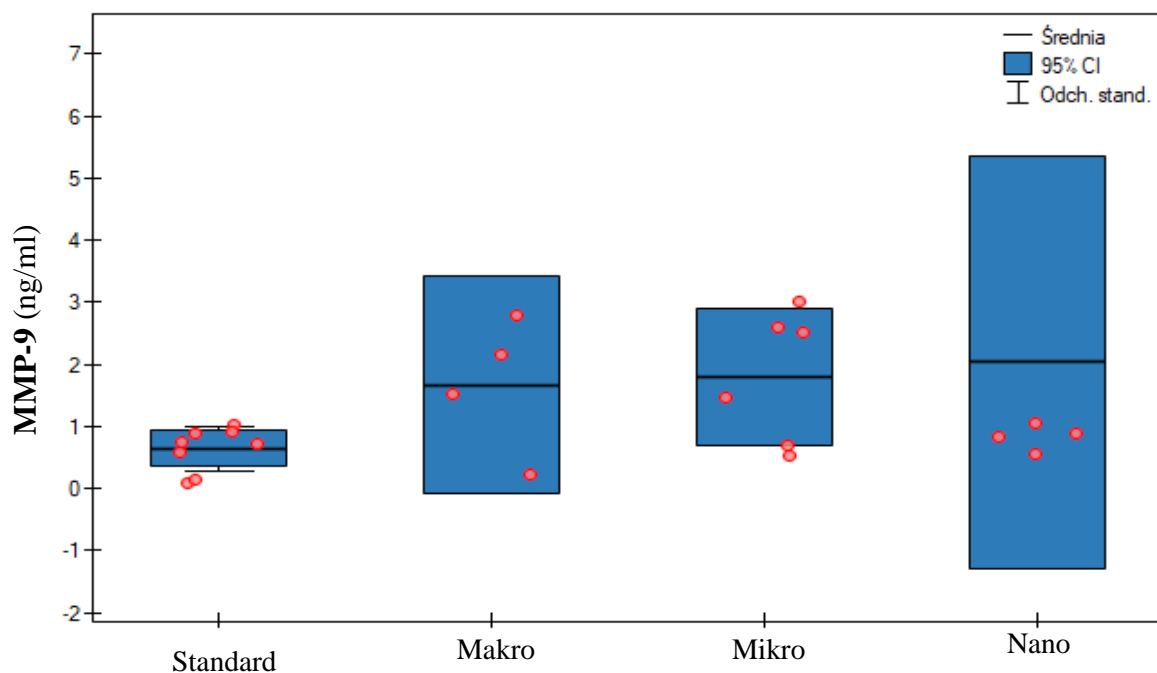
Rycina 46. Zawartość IL-6 (pg/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; Il6-interleukina 6; pg: pikogram; ml: mililitr.



Rycina 47. Zawartość IL-1 (pg/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; Il1 - interleukina 1; pg: pikogram; ml: mililitr.



Rycina 48. Zawartość MMP-9 (ng/ml) w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA i suplementowanych makro, mikro i nanogenisteiną.

Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD); Standard: zwierzęta otrzymujące wyłącznie dietę standardową (bez suplementacji); Makro: zwierzęta suplementowane makrogenisteiną; Mikro: zwierzęta suplementowane mikrogenisteiną; Nano: zwierzęta suplementowane nanogenisteiną; MMP-9 - metaloproteinaza 9; ng: nanogram; ml: mililitr.

Na podstawie uzyskanych wyników badań nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości Interleukiny 1, Interleukiny 6 i Metaloproteinazy 9 w surowicy krwi szczurów suplementowanych genisteiną, w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji.

V. DYSKUSJA

W poszukiwaniu związków o działaniu przeciwnowotworowym dużą uwagę zwraca się na badania dotyczące genisteiny. Genisteina zaliczana jest do grupy izoflawonów. Głównym źródłem genisteiny w diecie jest soja i produkty sojowe. Ponadto występuje ona również m.in. w kielkach lucerny i kończyny, brokułach, kalafiorze, czy jęczmieniu. Warto podkreślić, iż w aptekach dostępnych jest szereg preparatów zawierających ekstrakty z soi bądź genisteinę. W licznych badaniach wykazano, że genisteina może wykazywać działanie przeciwnowotworowe m.in. poprzez indukowanie apoptozy, wpływ na cykl komórkowy, hamowanie procesu angiogenezy, aktywność antyproliferacyjną [3]. Z drugiej strony istnieją dane potwierdzające pronowotworowe działanie genisteiny, szczególnie w typach nowotworów hormonozależnych [4-8]. Jedną z najbardziej znanych właściwości genisteiny jest jej aktywność estrogenna. Fitoestrogeny mają strukturę chemiczną podobną do 17 β -estradiolu i wykazują zdolność do wiązania się z receptorem estrogenowym. W związku z powyższym mogą stymulować proces kancerogenezy i zwiększać ryzyko zachorowania na raka hormonozależnego. Estrogeny mogą wywoływać efekt karcinogeny przez mechanizmy zależne od receptorów estrogenowych, ale także przez działanie genotoksycznych produktów metabolizmu estrogenów [194]. Działanie genisteiny w kontekście terapii chorób nowotworowych zależy prawdopodobnie od zastosowania konkretnej dawki, stanu fizjologicznego badanego organizmu oraz diety. Nadal nie wiemy komu i w jakich dawkach należy podawać genisteinę, aby osiągnąć pożądany efekt zdrowotny, do końca nieznany jest mechanizm jej działania na etapie inicjacji i progresji procesu nowotworowego. Istotna jest również odpowiedź na pytanie czy stosowanie suplementów zawierających genisteinę w kontekście ryzyka rozwoju choroby nowotworowej, jest dla kobiet bezpieczne. Kolejnym ważnym aspektem jest odpowiedź na pytanie w jaki sposób będzie działała genisteina w formach mikro i nano? Nanocząstki wykazują inną aktywność fizyczną, chemiczną i biologiczną niż makrozwiązki. Należy zaznaczyć, że w piśmiennictwie wciąż brakuje badań z przedstawionego zakresu.

W związku z powyższym celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na intensywność przebiegu procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów oraz poznanie mechanizmów tego działania.

W pierwszym etapie badań wykazano, że rozwój, jak i przebieg procesu nowotworowego zależą od zastosowanej suplementacji. Wbrew oczekiwaniom, stwierdzono, że suplementacja zwierząt genisteiną w formie makro, mikro i nano spowodowała wzrost intensywności przebiegu procesu nowotworowego u szczurów. Wykazano, iż w przypadku

zwierząt suplementowanych nanogenisteiną pierwsze guzy pojawiły się już w 14 tygodniu życia zwierząt, czyli 2 tygodnie wcześniej niż u zwierząt otrzymujących tylko standardową dietę i 3 tygodnie wcześniej niż u zwierząt otrzymujących makro i mikrogenisteinę i zachorowalność w tej grupie zwierząt wynosiła 100%. Co ciekawe w grupie suplementowanej mikrogenisteiną zachorowalność wyniosła 88%, jednakże w próbkach guzów pobranych od zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną w badaniu histopatologicznym wykazano III stopień złośliwości gruczolaka (*adenocarcinoma*). U zwierząt otrzymujących wyłącznie standardową dietę oraz u zwierząt z suplementacją makrogenisteiną stwierdzono gruczolaka o II stopniu złośliwości. Ponadto zwierzęta suplementowane nano i mikrogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą masą guzów odpowiednio: 1.59 ± 2.64 g i 1.99 ± 1.75 g, w porównaniu do zwierząt pozbawionych suplementacji: 0.93 ± 1.34 g., co również świadczy o szybszym postępie procesu kancerogenezy w tych grupach zwierząt. Dokonano oceny potencjału proliferacyjnego komórek guzów nowotworowych. Wyższy potencjał proliferacyjny jest związany ze złym rokowaniem i świadczy o szybkim namnażaniu się komórek nowotworowych [241]. W przypadku zwierząt suplementowanych genisteiną wykazano nasiloną proliferację komórek nowotworowych. Suplementacja nanogenisteiną zwiększyła istotnie statystycznie średnią liczbę mitoz ponad trzykrotnie, mikrogenisteiną aż czterokrotnie, a makrogenisteina ponad dwukrotnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano, że śledziona i wątroby pobrane od zwierząt suplementowanych genisteiną charakteryzowały się wyższą masą, w odniesieniu do masy narządów szczurów pozbawionych suplementacji, jednakże ze względu na wysoką wartość odchylenia standardowego nie były to wartości istotne statystycznie. Powiększenie śledziona i wątroby jest bardzo często obserwowane u pacjentów i zwierząt w przebiegu chorób nowotworowych [260- 262].

Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, iż intensywność przebiegu procesu kancerogenezy była najwyższa w przypadku zwierząt suplementowanych nano i mikrogenisteiną. Nanocząstki łatwo pokonują bariery, co w efekcie zwiększa akumulację nanocząstek w komórkach nowotworowych. Forma nano może powodować zmianę biodostępności związków. Redukcja genisteiny do wielkości nano i mikro, prawdopodobnie zmieniła biodostępność związków i zarazem zwiększyła zawartość tego związku w komórkach nowotworowych. Ju Y. H. i wsp. [263] wykazali, iż potencjał kancerogeny genisteiny zależy od dawki genisteiny. Stosowanie wyższych stężeń tego związku były związane ze wzrostem guzów piersi, zwiększoną proliferacją komórek i ekspresją pS2. Redukcja materiałów do skali nano może czasami prowadzić do rozwoju nowych właściwości

strukturalnych, fitochemicznych, elektronicznych i magnetycznych, które nie są obecne w większych cząstkach zawierających ten sam materiał. Nanocząstki mają nowe właściwości fizyczne, takie jak zwiększony stosunek powierzchni do objętości, inne miejsca reaktywne, ładunek, kształt, mobilność i właściwości termiczne. Forma cząstek może jednoznacznie zmienić ich właściwości, a tym samym wpływ nanocząsteczek na działanie biologiczne. Z tego powodu związki te idealnie nadają się do diagnostyki i leczenia różnych chorób pozwalając na wcześniejsze wykrycie zmian patologicznych i skuteczniejsze leczenie pacjentów. Dotychczas przeprowadzone badania kliniczne i obserwacje wskazują, że działanie genisteiny jest niejednoznaczne - niektóre z nich wykazują na jej działanie ochronne w raku, a inne kancerogenne. Biorąc jednak pod uwagę strukturę genisteiny i jej udowodniony potencjał do nasilania proliferacji komórek nowotworowych, w szczególności w nowotworach hormonozależnych, zastosowanie redukcji wielkości cząsteczek w moim badaniu miało odwrotny wpływ i nasiliło chorobę nowotworową.

Wyniki badań, przeprowadzonych przez wielu naukowców, wykazały, iż istotną rolę w inicjacji i progresji procesu nowotworowego, oprócz czynników genetycznych, mogą odgrywać zmiany na poziomie epigenetycznym [264]. Termin epigenetyka odnosi się do modyfikacji w ekspresji genów poprzez zmiany w metylacji DNA i strukturze chromatyny [265-268]. Intensywność zmian może regulować dynamikę ekspresji genów. Do kluczowych procesów odpowiedzialnych za regulację epigenetyczną zaliczamy metylację DNA, modyfikację histonów oraz potranskrypcyjną regulację genów przez niekodujące RNA określane jako mikroRNA (miRNA) [268]. Mechanizmy te są krytycznymi elementami w prawidłowym rozwoju i wzroście komórek, a ich modyfikacje przyczyniają się do powstawania między innymi fenotypów nowotworowych [269]. Wieloletnie obserwacje i badania wykazały, iż czynniki środowiskowe, takie jak: zanieczyszczenia środowiska, nieodpowiednia dieta, otyłość czy stres mają istotny wpływ na powstawanie zmian epigenetycznych [270]. Najczęściej badaną i najlepiej poznaną modyfikacją epigenetyczną jest proces metylacji. Zmiany globalnego lub miejscowego modelu metylacji DNA mogą oddziaływać na całość procesów związanych z przebiegiem transformacji nowotworowej zachodzących zarówno drogą zmian genetycznych, jak i epigenetycznych. Podczas procesu nowotworzenia dochodzić może do hipermetylacji wysp CpG, sekwencji powtórzonych DNA, genów uczestniczących w kontroli przebiegu cyklu komórkowego (p14, p15, p16), oporności na leki, angiogenezy, różnicowania komórkowego, czy naprawy uszkodzonego DNA [27, 30, 8]. Wykazano, iż hipermetylacja może również zachodzić w obrębie genu BRCA1, który jest odpowiedzialny za

występowanie dziedzicznego raka piersi, a wyciszenie epigenetyczne tego genu może prowadzić do inicjacji nowotworu [271]. Wpływ hipometylacji na onkogenezę wyraża się nadekspresją onkogenów spowodowaną demetylacją regionów promotorowych tych onkogenów. Należą do nich między innymi geny: C-myc, c-fos, bcl-2, raf. Modyfikacje histonów wpływają na strukturę chromaty, przez co mogą odgrywać istotną rolę w regulacji genów, deregulacji miRNA oraz kancerogenezie [272]. Dotychczasowe badania porównujące profile ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych i tkankach zdrowych wskazują na rozległe zmiany w ekspresji miRNA podczas kancerogenezy. miRNA wywołują dziedziczne zmiany w ekspresji genów bez zmiany sekwencji DNA i w ten sposób przyczyniają się do powstawania zmian epigenetycznych. Ponadto, miRNA mogą zarówno regulować, jak i być regulowane przez inne mechanizmy epigenetyczne i są zaangażowane w regulację transkrypcji, proliferację komórek i apoptozę (najczęstsze procesy związane z onkogenezą), a zmiana ich ekspresji może sprzyjać powstawaniu nowotworów [272]. Chociaż miRNA są niezbędne dla prawidłowej fizjologii komórek, ich nieprawidłowa ekspresja może przyczyniać się do rozwoju szeregu chorób, w tym raka [270].

Zmiany profilu epigenetycznego materiału genetycznego mogą być oceniane poprzez pomiar zawartości w moczu i surowicy następujących związków: 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, O-metyloguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny. Powyższe związki uważane są za obiecujące biomarkery w działaniach prewencyjnych i śledzeniu rozwoju procesu nowotworowego. Podwyższone stężenie badanych markerów w moczu stwierdzono u pacjentów min. z nowotworami piersi, płuc, jajników, pęcherza moczowego czy jelita grubego [273-283]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że suplementacja zwierząt genisteiną powoduje wzrost wydalania wyżej wymienionych metylowanych pochodnych w moczu szczurów traktowanych 7,12-dimetylobezno[a]antracem. Wpływ genisteiny na powstawanie pochodnych metylowych jest szczególnie istotny we wczesnych etapach kancerogenezy. W przypadku zwierząt otrzymujących jedynie standardową dietę, poziom pochodnych metylowych wzrastał w trakcie trwania badania (O-metyloguanozyna, 1-metyloadenozyna, 7-metyloguanozyna) lub pozostawał na stosunkowo niskim poziomie przez cały okres badania (3-metyloadenina, 1-metyloguanina, 7-metyloguanina, N6-metylo-2'-deoksyadenozyna). U zwierząt suplementowanych genisteiną stężenie metylowych pochodnych w moczu było od początku bardzo wysokie. Warto zauważyć, że najwyższe poziomy zmodyfikowanych nukleozydów stwierdzono w moczu zwierząt suplementowanych

genisteiną w 9 i 11 tygodniu życia, co mogło się przyczynić do stymulacji rozwoju procesu nowotworowego. Wykazano synergiczną reakcję DMBA i genisteiny w rozwoju procesu nowotworowego u szczurów. Wysokie poziomy pochodnych metylowych mogą być związane ze zmianami w metabolizmie RNA oraz rozległymi uszkodzeniami DNA, które są związane między innymi z procesem kancerogenezy [284]. Wykazano, że wzrost ekspresji genów może być spowodowany metylacją N-7 guaniny wysp CpG, co może przyczyniać się do wzrostu interakcji białka/DNA oraz remodelingu chromatyny [285]. Istotna rola 7-metyloguanozyny w rozwoju chorób człowieka, zwłaszcza nowotworów, może wynikać z jej wpływu na regulację ekspresji onkogenów i genów supresorowych oraz regulacji metabolizmu mRNA, miRNA, tRNA oraz rRNA [280]. Dysregulacja stężenia N6-metylo-2'-deoksyguanozyny może przyczyniać się do rozwoju chorób, w tym choroby nowotworowej [283]. Związek ten bierze udział w regulacji transkrypcji genów, procesie naprawy DNA czy procesie replikacji [286]. Warto podkreślić, iż 3-metyloadenina jest, poprzez hamujący wpływ na ścieżkę sygnałową kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) klasy III, potencjalnym inhibitorem procesu autofagii. Autofagia jest katabolicznym procesem autodestrukcji, odgrywającym istotną rolę w śmierci i przeżyciu komórki i rozwoju nowotworów. Istnieją doniesienia potwierdzające, że zahamowanie autofagii może stymulować rozwój i progresję procesu nowotworowego. Cho i wsp. [281] wykazali istotnie statystyczny wzrost zawartości 1-metyloadenozyny ($p < 0.005$), N²,N²-dimetyloguanozyny ($p < 0.01$), 5-hydroksymetylo-2'-deoksyurydyny ($p < 0.001$), 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny ($p < 0.001$) w moczu pacjentek z nowotworem piersi ($n=30$) w odniesieniu do kobiet zdrowych. Bobrowska-Korczak i wsp. [282] stwierdzili wzrost zawartości O-metyloguanozyny, 7-metyloguanozyny oraz 1-metyloadenozyny wraz z rozwojem procesu nowotworowego w moczu szczurów traktowanych DMBA. Wykazali, że suplementacja zwierząt nanocynkiem powoduje zahamowanie rozwoju procesu nowotworowego indukowanego DMBA oraz istotne statystycznie obniżenie stężenia 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 7-metyloguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu badanych zwierząt. Porcelli i wsp. [275] stwierdzili, iż wzrost stężenia 1-metyloguaniny w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego był skutkiem zwiększonego metabolizmu kwasów nukleinowych w tkance nowotworowej, i/bądź wzrostu stopnia ich metylacji. Zawartość 7-metyloguaniny w moczu wzrasta podczas starzenia się organizmu, co może być związane z zaburzeniami procesu metylacji i przyczyniać się może do indukcji raka. Podwyższone stężenie 1-metyloadenozyny stwierdzono u pacjentów z rakiem piersi, jak również z reumatoidalnym zapaleniem stawów [287-289].

Podsumowując uzyskane wyniki badań można stwierdzić, że zawartość modyfikowanych związków metylowych zależy od rodzaju zastosowanej suplementacji. Intensywny wzrost zawartości badanych metylo pochodnych w moczu szczurów może być efektem synergicznej reakcji DMBA z nano, mikro i makrogenisteiną. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż najwyższe stężenia badanych markerów w moczu szczurów stwierdzono we wczesnym etapie rozwoju procesu nowotworowego. Poznanie mechanizmów działania składników diety na procesy epigenetyczne może mieć ogromne znaczenie w ich wykorzystaniu zarówno w profilaktyce, jak również wspomaganiu leczenia farmakologicznego nowotworów, ale również w ocenie bezpieczeństwa stosowania w/w związków.

Liczne badania wykazały, że w przebiegu procesu nowotworowego zaburzony jest metabolizm kwasów tłuszczowych [252, 290-291]. W związku z powyższym w kolejnym etapie prowadzonych badań dokonano oceny wpływu suplementacji makro, mikro i nanogenisteiną na zawartość, wzajemne proporcje i metabolizm kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem kancerogennym. Dokonano oceny wpływu genisteiny na aktywność $\Delta 6$ -desaturazy oraz $\Delta 5$ -desaturazy oraz stopień aterogenności i trombogenności kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego.

Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu ustalenie związku między rodzajem spożywanych z żywnością kwasów tłuszczowych, a ryzykiem wystąpienia chorób. Na wartość żywieniową produktów spożywczych istotny wpływ ma rodzaj zawartych w nich kwasów tłuszczowych, w szczególności ich budowa - długość łańcucha, obecność wiązań nienasyconych, ich liczba, położenie i konfiguracja, czyli tzw. izomeria położenia, cis-trans. Kwasy tłuszczowe nasycone (saturated fatty acids - SFA) charakteryzują się występowaniem między atomami węgla wyłącznie wiązań pojedynczych. Jeżeli w łańcuchu węglowym pomiędzy atomami węgla występuje tylko jedno wiązanie podwójne, są to kwasy tłuszczowe mononienasycone (monounsaturated fatty acids - MUFA), natomiast jeżeli w łańcuchu znajduje się więcej niż jedno wiązanie podwójne, wówczas są to kwasy wielonienasycone (polyunsaturated fatty acids - PUFA). Tłuszcze dostarczone do organizmu z pożywieniem są źródłem energii niezbędnej do zapewnienia prawidłowego rozwoju i utrzymania funkcji życiowych organizmu [292-294]. Połowa wytworzonej energii wykorzystywana jest w czasie przemian metabolicznych, natomiast pozostała część zamieniana jest na ciepło [296]. Kwasy tłuszczowe są składnikami fosfolipidów błon komórkowych, gdzie odgrywają rolę strukturalną (budulcową) i funkcjonalną. Mogą wpływać na metabolizm komórkowy, regulację ekspresji

genów oraz są prekursorami wielu związków sygnałowych [292-294]. Ze względu na brak w organizmie człowieka układów enzymatycznych zdolnych do wprowadzania wiązań podwójnych w pozycji n-3 i n-6 łańcucha węglowego kwasy: α -linolenowy (ALA, 18:3 n-3) i linolowy (LA, 18:2 n-6) nie mogą być syntetyzowane *de novo*, a ich jedynym źródłem jest dieta. Z tego powodu obydwa w/w kwasy, będące prekursorami rodzin odpowiednio n-3 i n-6, określane są jako niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) [296]. W wyniku działania enzymów: $\Delta 5$ i $\Delta 6$ -desaturaz oraz elongaz, poprzez kolejne przemiany, z kwasu ALA powstaje kwas eikozapentaenowy (EPA, C20:5 n-3), kwas dokozapentaenowy (DPA, C22:5 n-3), a następnie kwas dokozaheksaenowy (DHA, C22:6 n-3). Natomiast z kwasu LA powstaje kwas arachidonowy (C20:4 n-6). Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe są substratami w syntezie eikozanoidów - biologicznie aktywnych substancji o charakterze hormonów tkankowych. Wśród eikozanoidów można wyróżnić: prostaglandyny, prostacykliny, tromboksany, leukotrieny i lipoksyny [296]. Przeprowadzono szereg badań mających na celu znalezienie zależności pomiędzy spożyciem poszczególnych kwasów tłuszczowych, a ryzykiem wystąpienia raka. Analiza wyników wykazała, że zwiększona podaż SFA wraz z dietą wiązała się z obniżonym ryzykiem zachorowania na nowotwory [297]. Wpływ jednonienasyconych kwasów tłuszczowych na rozwój raka nie jest do końca poznany, a wyniki przeprowadzonych badań często są ze sobą sprzeczne. Autorzy wielu badań wykazali, że wysokie spożycie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych rodziny n-3 oraz odpowiedni stosunek kwasów tłuszczowych n3/n6 w diecie działają przeciwnowotworowo w wielu typach nowotworów, w tym raku piersi [298, 299]. Wzbogacanie diety w długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3, na przykład poprzez spożywanie ryb, może zwiększyć przeżywalność kobiet, u których wykryto raka piersi [300]. Stwierdzono, że dieta bogata w kwasy tłuszczowe rodziny n-3 zmniejsza śmiertelność o 16-34% [300].

W przeprowadzonym badaniu, w surowicy krwi szczurów, określono zawartość 17 kwasów tłuszczowych, w tym 6. kwasów nasyconych, 4. kwasów jednonienasyconych i 7. Kwasów wielonienasyconych. W największej ilości, w badanym materiale biologicznym, występowały kwasy: palmitynowy (C16:0) (w zakresie: 599±144 - 776±118), stearynowy (C18:0) (w zakresie: 312±55 - 412±94), oleinowy (C18:1 n-9) (w zakresie: 230±117 - 341±89) oraz kwas linolowy (C18:2, n-6) (w zakresie: 588±207 - 861±166). Wykazano, że suplementacja zwierząt genisteiną nie wpływa w sposób istotny statystycznie na całkowite stężenie nasyconych kwasów tłuszczowych. Jednak analizując zawartość poszczególnych kwasów stwierdzono, że zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały

się istotnie statystycznie wyższą zawartością w surowicy krwi kwasu pentadekanowego (C15:0) i heptadekanowego (C17:0) (z puli kwasów nasyconych), w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Co ciekawe, badania, które opisał Bao i wsp. w 2020 roku [301] wyraźnie wskazują, że oba w/w kwasy tłuszczowe wykazują działanie cytotoksyczne na komórki raka piersi typu MCF-7 i MCF-7/SC. Dla przykładu wykazano, że kwas pentadekanowy hamował zdolność migracyjną i inwazyjną komórek, hamował, indukowaną przez interleukinę-6, sygnalizację JAK2/STAT3, powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie sub-G1 oraz stymulował proces apoptozy [301]. Opisane przez autorów wyniki badań wskazują na potencjalną aktywność przeciwnowotworową w/w nasyconych kwasów tłuszczowych. Na podstawie przedstawionych w pracy wyników badań można stwierdzić, że genisteina, w zależności od wielkości suplementowanych cząstek, wpływa na zawartość nieparzystych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów. Wzrost stężenia kwasu pentadekanowego i heptadekanowego w surowicy krwi zwierząt suplementowanych nano i mikrogenisteiną może wskazywać na jej działanie ochronne (poprzez akumulację kwasów tłuszczowych, o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym). Niestety równocześnie u zwierząt suplementowanych genisteiną stwierdzono wzrost intensywności rozwoju procesu nowotworowego. Warto podkreślić, iż wzrost kwasów tłuszczowych nastąpił w fizjologicznym zakresie stężeń, a nie w skrajnym niedoborze. Być może stężenia w/w kwasów nasyconych były zbyt niskie aby wywołać efekt przeciwnowotworowy. Eksperyment Bao i wsp. [301] został przeprowadzony w warunkach *in vitro*, na komórkach raka piersi traktowanych wysokimi stężeniami kwasów tłuszczowych.

Wielu badaczy potwierdziło, iż u pacjentów z chorobą nowotworową proporcje kwasów tłuszczowych (nasyconych, mono i wielonasyconych) w osoczu krwi są zaburzone, w porównaniu do osób zdrowych [302]. U osób chorych na nowotwory wykazano wzrost stężenia kwasów jednonienasyconych (MUFA), przy jednoczesnym obniżeniu stężenia kwasów nasyconych SFA [303]. Wykazano zależność pomiędzy zwiększonym stężeniem MUFA w osoczu u ludzi, a zwiększonym ryzykiem rozwoju raka [305-307]. Uważa się, że jednonienasycone kwasy tłuszczowe pełnią rolę mediatora w transdukcji sygnałów oraz różnicowaniu komórek [304-305]. W przeprowadzonym badaniu zawartość MUFA była wyższa w surowicy krwi szczurów suplementowanych genisteiną i wynosiła odpowiednio: 516 ± 137 $\mu\text{g/ml}$ (nano); 511 ± 170 $\mu\text{g/ml}$ (mikro), 412 ± 95 $\mu\text{g/ml}$ (makro), w odniesieniu do zwierząt pozbawionych suplementacji - 334 ± 140 $\mu\text{g/ml}$. Ze względu na wysokie wartości odchylenia standardowego nie były to jednak wartości istotne statystycznie. Wykazano, że

zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością kwasów: palmitooleinowego, heksadecenowego, wakcenenowego, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Lope i wsp. [299] stwierdzili, że kobiety z wysokimi stężeniami kwasu palmitooleinowego oraz wysokim stosunkiem kwasu oleinowego do stearynowego charakteryzowały się podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Byberg i wsp. [307] wykazali, że ryzyko śmierci pacjentów z chorobą nowotworową jest wyższe w przypadku osób z wysoką zawartością w surowicy krwi kwasu palmitooleinowego. Zawartość kwasu 16:1 n-7 oraz stosunek kwasów: (16:1n-7) do (16:0) w surowicy krwi pacjentów z chorobą nowotworową ściśle koreluje ze wzrostem ich śmiertelności. Luo i wsp. [298] stwierdzili, że stężenie kwasu palmitynowego (C16:1 n-7) oraz kwasu oleinowego (C18:1 n-9) jest istotnie statystycznie wyższe w komórkach raka piersi (MCF-7-CSC and EMT-CSC), w odniesieniu do komórek zdrowych (brak CSC).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe odgrywają istotną rolę w modulacji szeregu procesów, takich jak metabolizm, regulacja ekspresji genów, sygnalizacja komórkowa, czy występowanie stanu zapalnego oraz wpływają na strukturę błon komórkowych [308]. Badania naukowe jednoznacznie wskazują, że zarówno stężenia MUFA, jak i PUFA są wyższe w surowicy pacjentów z nowotworami, niż w grupach kontrolnych [305, 306, 308]. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotnie statystycznie wyższą zawartość jednonienasyconych, jak również wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (wartość sumaryczna) w surowicy krwi zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji), jak również suplementowanych makrogenisteiną. Stwierdzono, że stosunek MUFA i PUFA do SFA oraz MUFA do PUFA był istotnie statystycznie wyższy w grupach zwierząt suplementowanych mikro i makrogenisteiną, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (pozbawionych suplementacji). Konieczność budowy nowych błon komórkowych w procesie replikacji komórek nowotworowych jest priorytetem [189]. Dostępność odpowiednich kwasów tłuszczowych zapewnia, że błona komórkowa dzielących się komórek ma odpowiednią strukturę i funkcjonalność. Odpowiednia podaż kwasów MUFA i PUFA zapewniają odpowiednią płynność, funkcjonalność i elastyczność błon komórkowych. W związku z powyższym, przy udziale $\Delta 9$ -desaturazy (znanej jako desaturaza stearyloCoA A, SCD-1) kwasy nasycone przekształcane są do kwasów jednonienasyconych. Substratami w/w reakcji są najczęściej kwas palmitynowy (C16:0) oraz kwas stearynowy (18:0). U pacjentów z chorobą

nowotworową stwierdzono występowanie nadekspresji genu $\Delta 9$ -desaturazy regulowaną przez kaskady sygnalizacyjne typu MAPK i AKT. Dostępność PUFA w puli lipidów regulowana jest poprzez zawartość kwasów omega 3 i omega 6 w diecie. Odpowiednia podaż PUFA jest niezbędna do budowy błon komórkowych o odpowiednim składzie, ale również wielonienasycone kwasy tłuszczowe są prekursorami mediatorów stanu zapalnego. Stan zapalny jest istotnym czynnikiem powodującym aktywację komórek nowotworowych do proliferacji. Co ciekawe, zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością kwasów: kwasów linolowego, gamma-linolenowego i arachidonowego, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Kwas linolowy jest prekursorem kwasu arachidonowego i eikozanoidów o działaniu prozapalnym. Eikozanoidy stymulują proliferację komórek nowotworowych i wzrost tkanki zmienionej nowotworowo [189]. Kwas linolowy wpływa promująco na angiogenezę komórek nowotworowych, co przyspiesza rozwój guza, zwiększa jego objętość i prowadzi do powstawania przerzutów [309]. Stwierdzono, że suplementacja zwierząt nanogenisteiną wykazała tendencję do stymulowania aktywności $\Delta 5$ -desaturazy. Z badań wynika, iż istnieje zależność pomiędzy aktywnością $\Delta 5$ -desaturazy i rozwojem raka [310]. $\Delta 5$ -desaturaza może stymulować proces kancerogenezy poprzez wpływ na metabolizm kwasów tłuszczowych w środowisku guza. Kwas arachidonowy może być przy udziale cyklooksygenazy 2 (COX-2) i syntetazy przekształcany do prostaglandyny E2 (PGE2). Wzrost zawartości PGF2 i aktywności COX-2 stymuluje proliferację, inwazję i hamuje apoptozę komórek nowotworowych [310]. Wielu badaczy uważa, że zahamowanie aktywności $\Delta 5$ -desaturazy powinno być potencjalnym celem w nowych terapiach przeciwnowotworowych [310]. W surowicy krwi szczurów suplementowanych makrogenisteiną wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie kwasów EPA i DHA, w odniesieniu do wszystkich pozostałych grup. Szereg badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* dowodzi, że kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 hamują rozwój komórek raka gruczołu sutkowego [311]. Wykazano ujemną zależność między stężeniami kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w surowicy krwi, a ryzykiem występowania nowotworów [300]. W grupie zwierząt suplementowanych makrogenisteiną stwierdzono najniższą aktywność $\Delta 5$ -desaturazy, jak również istotnie statystycznie najwyższą wartość indeksu aterogennego i trombogennego, w odniesieniu do zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną, jak i pozbawionych suplementacji.

Podsumowując, można stwierdzić, że suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną wpływa zarówno na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych, jak i

profil kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA. Warto podkreślić, iż w ocenie wpływu wybranych składników diety na zawartość i profil kwasów tłuszczowych istotna jest indywidualna analiza ich stężeń, jak również ocena aktywności desaturaz. Warto podkreślić, że suplementacja zwierząt zarówno makro, mikro, jak i nanogenisteiną stymulowała intensywność procesu nowotworowego, ale mechanizm tego działania nie zawsze był analogiczny.

Następnym celem prowadzonych badań była ocena wpływu nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hidroksyeikozatetraenowych, kwasów hydroksyoktadekadienowych oraz kwasu 12-hidroksyeikozapentaenowego w surowicy krwi szczurów traktowanych czynnikiem kancerogennym. Zbadano wpływ suplementacji genisteiną na zawartość interleukiny 6, interleukiny 1 oraz metaloproteinazy 9 w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA. Stan zapalny jest jednym z czynników inicjacji i progresji procesu nowotworowego [312, 313]. Kwasy tłuszczowe podlegają procesom metabolicznym, na drodze których powstają substancje o charakterze modulatorów odpowiedzi immunologicznych i stanów zapalnych między innymi: pochodne kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETE), hydroksyoktadekadienowych (HODE) oraz hydroksyeikozapentaenowych (HEPE) [314, 315]. Kwas arachidonowy, metabolizowany przez enzymy odpowiednio 5-, 12- i 15-lipooksygenazę (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX), jest przekształcany w kwasy hydroksyeikozatetraenowe, odpowiednio kwas 5-hidroksyeikozatetraenowy (5-HETE), kwas 12-hidroksyeikozatetraenowy (12-HETE) oraz kwas 15-hidroksyeikozatetraenowy (15-HETE). Kwasy hydroksyoktadekadienowe (HODE) powstają na drodze metabolizmu kwasu linolowego. W wyniku utleniania kwasu linolowego poprzez 12-LOX i 15-LOX powstają: kwas 9-hidroksyoktadekadienowy (9-HODE) oraz kwas 13-hidroksyoktadekadienowy (13-HODE). Przy udziale 12-lipooksygenazy z kwasu eikozapentaenowego powstaje kwas 12-hidroksyeikozapentaenowy (12-HEPE). Wyżej wymienione metabolity kwasów tłuszczowych nawet w bardzo małych stężeniach charakteryzują się dużą aktywnością biologiczną [313-316]. Mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju i przebiegu szeregu chorób, w tym miażdżycy, chorób układu krążenia, alergii, chorób o podłożu autoimmunologicznym czy chorób nowotworowych. Kierunek tego działania zależy od typu powstałych związków i kaskady reakcji, w których biorą one udział [313, 314]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotnie statystycznie niższą zawartość 12-HEPE ($p=0,001$); HODE ($p=0,0001$) oraz 12-HETE ($p=0,0001$) w surowicy krwi szczurów suplementowanych genisteiną, w odniesieniu do zawartości w/w markerów w surowicy krwi szczurów otrzymujących wyłącznie dietę

standardową (pozbawionych suplementacji). Kwas 15-HEPE jest uznawany za możliwy modulator procesu nowotworowego. Traktowanie komórek nowotworowych 15-HEPE powoduje zahamowanie ich wzrostu. Stwierdzono, iż 15-HEPE powoduje zahamowanie wychwytu ³H-tymidyny (markera proliferacji i wzrostu komórek) przez komórki nowotworowe. Wykazuje działanie modulujące proliferację i apoptozę komórek [317]. Kwas 13-HODE może wpływać na rozwój i przebieg procesu nowotworowego poprzez regulację ruchliwości komórek rakowych oraz ich adhezję i migrację poprzez kapilary w śródbłonku. Jeżeli komórki nowotworowe nie mogą przylegać do śródbłonka oraz migrować przez barierę, utrudnia to stabilizację ognisk przerzutowych. Wykazano, że komórki nowotworowe wytwarzające niewielkie ilości 13-HODE odznaczają się łatwiejszą adhezją do śródbłonka. W badaniach przeprowadzonych przez Tavakoli-Yaraki M. i wsp. [318] stwierdzono, że 13-HODE hamuje wzrost komórek nowotworowych zarówno typu MCF-7, jak i MDA-MB-231. Powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i indukuje apoptozę, obniża poziom ekspresji receptora PPAR- δ . Wykazano, że zarówno ekspresja 15-LOX, jak i stężenie HODE są obniżone w komórkach raka [319]. Pacjentki z nowotworami piersi mają znacznie obniżony poziom 15-LOX w zmienionych nowotworowo tkankach gruczołu piersiowego, w odniesieniu do poziomu w tkankach gruczołu piersiowego pozyskanych od kobiet zdrowych [320, 321]. Trudno jest wytłumaczyć obniżenie stężenia 12-HETE w surowicy krwi badanych szczurów albowiem jest to związek o działaniu hamującym proces apoptozy, promującym angiogenezę guza oraz adhezję komórek nowotworowych do komórek śródbłonka [322]. Być może rezultat ten jest efektem hamującego działania genisteiny na aktywność zarówno 15, jak i 12 lipoksygenazy [323]. Interleukiny są białkami należącymi do grupy cytokin [324, 325]. Cytokiny odpowiedzialne są za komunikację pomiędzy komórkami. Warunkują one wzajemne oddziaływanie komórek. W stężeniach fizjologicznych interleukiny odgrywają istotną rolę w proliferacji, dojrzewaniu, migracji oraz adhezji komórek. Wykazano, że mają wpływ na procesy metaboliczne oraz układ neuroendokryny, biorąc tym samym udział w utrzymaniu homeostazy w organizmie [326]. Jednakże interleukiny mogą odgrywać również istotną rolę w procesie nowotworowych, w tym: w inicjacji kancerogenezy, angiogenezie oraz powstawaniu przerzutów [195, 327-329]. Wykazano występowanie podwyższonego stężenia interleukin IL-1 w płynach ustrojowych pacjentów chorych na nowotwory, w odniesieniu do osób zdrowych [330]. U pacjentów chorujących na nowotwory stwierdzono miejscową lub ogólnoustrojową nadekspresję genu kodującego IL-6 [196, 329, 330]. Badania przeprowadzone przez Kozłowskiego i wsp. [329] wykazały wyższe stężenie IL-6 w surowicy krwi pacjentek w III stadium choroby, w odniesieniu do pacjentek w II stadium choroby. Podwyższony poziom IL-

1 i/lub IL6 w surowicy krwi pacjentów zazwyczaj związany jest ze złym rokowaniem oraz niską przeżywalnością chorych na raka piersi [330, 331]. Wykazano, że w tkance zmienionej nowotworowo stężenie interleukin z rodziny 1 oraz IL-6 jest znacznie wyższe w odniesieniu do tkanki zdrowej [327]. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w zawartości IL-1 i IL 6 w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA, w zależności od zastosowanej suplementacji. Tang i wsp. [332] wykazali, że genisteina hamuje ekspresję genu i zapobiega tworzeniu się Il1 w przypadku traktowanych promieniowaniem UVB keratynocytów. Lee i wsp. [333] wykazali, że suplementacja genisteiną myszy traktowanych dietylnitrozoaminą (DEN) powoduje obniżenie ekspresji genów Il-6 i TNF (w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej). Przeciwwzapalne działanie genisteiny wykazano w szeregu badaniach [334]. Co ciekawe, stwierdzono, że zwierzęta suplementowane nano, mikro i makrogenisteiną charakteryzowały się wyższym stężeniem metaloproteinazy 9 - MMP-9, w porównaniu do zwierząt pozbawionych suplementacji ($0,64 \pm 0,35$ pg/mL), jednakże ze względu na wysoką wartość odchylenia standardowego wyniki te nie były istotne statystycznie. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej stanowią grupę metalozależnych enzymów proteolitycznych należących do endopeptydaz, uczestniczących w degradacji białek błon podstawowych i macierzy zewnątrzkomórkowej, co umożliwia przebudowę tkanek i przemieszczanie się komórek, zarówno w przebiegu procesów fizjologicznych, stanów zapalnych, jak i chorób nowotworowych [335]. MMP-9 reguluje aktywność czynników wzrostu, cytokin, a zwłaszcza chemokin [335]. Metaloproteinaza 9 odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia [336]. Charakteryzuje się zdolnością do degradacji kolagenu typu IV, a przez to uczestniczy w mechanizmie uszkodzenia błony podstawnej naczyń. Cecha ta warunkuje proces angiogenezy, miejscowego wzrostu nowotworu i powstanie przerzutów [336]. Po przekroczeniu błony podstawnej naczyń krwionośnych przez nowotwór zyskuje on możliwość tworzenia przerzutów w miejscach odległych od ogniska pierwotnego. W przypadku raka piersi stwierdzono wzrost stężenia i aktywności metaloproteinaz wraz z zaawansowaniem nowotworu. Ich wzmożona ekspresja w nacieku nowotworowym jest uważana za nowy czynnik prognostyczny, ale też za czynnik monitorujący skuteczność terapii w przebiegu choroby nowotworowej [336].

Podsumowując, wykazano, że suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną ma wpływ na stężenia markerów stanu zapalnego w surowicy krwi szczurów traktowanych 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Ze względu na rolę jaką stan zapalny może odgrywać w

rozwoju i przebiegu procesu nowotworowego niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

VI. WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że w zastosowanym modelu suplementacja genisteiną działała synergistycznie z DMBA i stymulowała rozwój procesu nowotworowego u szczurów. Nanogenisteina stymulowała inicjację procesu nowotworowego, powodowała wzrost masy guzów oraz wzrost złośliwości. Makro i mikrogenisteina stymulowały wzrost intensywności proliferacji komórek nowotworowych.
2. Wykazano, iż zawartość wybranych metylo pochodnych w moczu szczurów zależy od rodzaju zastosowanej suplementacji. Skutkiem suplementacji zwierząt genisteiną był wzrost zawartości 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, O-metyloguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu szczurów w warunkach procesu nowotworowego. Poznanie mechanizmów działania składników diety na procesy epigenetyczne może mieć ogromne znaczenie w ich wykorzystaniu zarówno w profilaktyce, jak również w wspomaganiu leczenia farmakologicznego nowotworów, ale również w ocenie bezpieczeństwa ich stosowania.
3. Podsumowując, można stwierdzić, że suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną wpływa zarówno na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych, jak również profil kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA. Zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością kwasów: pentadekanowego, heptadekanowego, palmitooleinowego, heksadecenowego, wakcenowego oraz kwasów linolowego, gamma-linolenowego i arachidonowego w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Wykazano istotnie statystycznie wyższą zawartość zarówno jednonienasyconych, jak i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (wartość sumaryczna) w surowicy krwi zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji).
4. Suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną ma wpływ na stężenia markerów stanu zapalnego w surowicy krwi szczurów traktowanych 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Wykazano istotnie statystycznie niższą zawartość 12-

HEPE; HODE oraz 12-HETE w surowicy krwi szczurów suplementowanych genisteiną, w odniesieniu do zawartości w/w markerów w surowicy krwi szczurów otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji).

5. Intensywność przebiegu procesu nowotworowego, jak również zawartość wybranych biomarkerów w materiale biologicznym zależy od wielkości cząstek w jakich suplementowana była genisteina.
6. 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.

VII. PIŚMIENNICTWO

- [1] Krajowy Rejestr Nowotworów. Internet: <http://onkologia.org.pl/rak-piersi-kobiet/> (pobrano 03 czerwca 2022).
- [2] Bachelarda C.M., Coquanc E., du Rusqueca P. i wsp. Risks and benefits of anticancer drugs in advanced cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *E Clin Med.* 2021; 40: 1-8.
- [3] Bhat S.S., Prasad S.K., Shivamallu C. i wsp. Genistein: a potent anti-breast cancer. *Agent Curr Issues Mol. Biol.* 2021; 43: 1502-1517.
- [4] Khan S. A., Chatterton R. T., Michel N. i wsp. Soy isoflavone supplementation for breast cancer risk reduction: a randomized phase II trial. *Cancer Prev Res.* 2012; 5(2): 309-319.
- [5] Shike M., Doane A. S., Russo L. i wsp. The effects of soy supplementation on gene expression in breast cancer: a randomized placebo-controlled study. *JNCI.* 2014; 106(9): 1-12.
- [6] Lamartiniere C. A., Zhang J. X., Cotroneo M. S. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68: 1400-1405.
- [7] Ju Y. H., Allred K. F., Allred C.D. i wsp. Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinog.* 2006; 27: 1292-1299.
- [8] Liu R., Yua X., Chena X. i wsp. Individual factors define the overall effects of dietary genistein exposure on breast cancer patients. *Nutr Res.* 2019; 67: 1-16.
- [9] Anastasiadis S.P., Chrissopoulou K., Stratakis E. i wsp. How the physicochemical properties of manufactured nanomaterials affect their performance in dispersion and their applications in biomedicine. *Nanomaterials.* 2022; 12: 1-47.
- [10] World Health Organization. Breast cancer now most common form of cancer: WHO taking action. 2021. Internet: <https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-taking-action>.

- cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action (pobrano 03 czerwca 2022).
- [11] World Health Organization. Breast cancer. 2021. Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (pobrano 03 czerwca 2022)
- [12] Cancer Today. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2020. Internet: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis> (pobrano 03 czerwca 2022).
- [13] Shaoyuan L., 1 Rongshou Z., Siwei Z. i wsp. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. *Cancer Commun.* 2021; 41(11): 1183-1194.
- [14] Krajowy Rejestr Nowotworów. Piersi u kobiet. Internet: <http://onkologia.org.pl/rak-piersi-kobiet/> (pobrano 30 sierpnia 2022).
- [15] Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer (IARC). Internet: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0> (pobrano 30 sierpnia 2022).
- [16] Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer (IARC). Internet: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?mode=population&populations=616&cancers=20&types=0> (pobrano 30 sierpnia 2022).
- [17] Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer (IARC). Internet: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?mode=population&populations=616&cancers=20&types=1> (pobrano 30 sierpnia 2022).
- [18] Kornafel J. Rak Piersi, Centrum Medyczne Podyplomowego. Warszawa. 2011.
- [19] Testa U., Castelli G., Pelosi E. Breast cancer: A Molecularly Heterogenous Disease Needing Subtype-Specific Treatments. *Med Sci.* 2020; 8(1): 1-103.
- [20] Yager J. D., Davidson N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 354: 270-282.
- [21] Johnson M. C., Cutler M.L. Management of breast diseases. Anatomy and physiology of the breast. Springer. New York. 2016; 1-39.
- [22] Stingl J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Canc.* 2011; 2: 85-90.

- [23] Jassem J., Krzakowski M., Bobek-Billewicz B., i wsp. Rak piersi. *Onkol Prakt Klin Edu.* 2020; 6(5): 297-352.
- [24] Burguin A., Diorio C., Durocher F. Breast cancer treatments: Updates and New Challenges. *J. Pers. Med.* 2021; 11(8): 1-54.
- [25] Burstein H. J., Curigliano G., Loibl S. i wsp. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol.* 2019; 30(10): 1541-1557.
- [26] Nowecki Z. I., Jagiełło-Gruszczyńska A., Pogoda K. i wsp. Leczenie przedoperacyjne chorych na raka piersi i jego wpływ na postępowanie operacyjne oraz radioterapeutyczne (część 1.). *Nowotwory J Oncol.* 2021; 71: 17-25.
- [27] Al-thoubaity, F.K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann. Med Surg.* 2020; 49: 44-48.
- [28] Hergueta-Redondo M., Palacios J., Cano A. i wsp. New molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2008; 10: 777-85.
- [29] Hennigs A., Riedel F., Gondos A. i wsp. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer.* 2016; 734(16): 1-9.
- [30] Fragomeni S.M., Sciallis A., Jeruss J.S. Molecular subtypes and local - regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin.* 2018; 27: 95-120.
- [31] Jakimiuk A. J., Bogusiewicz M. Selektywne modulatory receptora estrogenowego - przełom w terapii menopauzy? *Przegląd Menopauzalny.* 2002; 4: 14-24.
- [32] NIH. Drugs Approved for Breast Cancer. Internet: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast> (pobrano 03 września 2022).
- [33] Thurlimann B., Keshaviah A., Mouridsen H. i wsp. BIG 1-98 Collaborative Group. Letrozole versus tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16): 511-511.
- [34] Niwińska A., Litwiniuk M. Hormonoterapia uzupełniająca raka piersi. *Współcz Onkol.* 2007; 11(2): 82-88.

- [35] Krzakowski M., Zajda K. Taksoidy w przedoperacyjnej chemioterapii raka piersi - rzeczywistość i wątpliwości. *Nowotwory J Oncol.* 2004; 54(3): 258-265.
- [36] NIH. Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)-HealthProfessional Version. Internet: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq> (pobrano 03 września 2022).
- [37] Głogowska I., Dubiański R., Skrzypczyk A. i wsp. Rola antracyklin w leczeniu zaawansowanego raka piersi — miejsce niepegylowanej doksorubicyny liposomalnej. *Onkol. Prak. Klin.* 2010; sup. A: A8-A17.
- [38] Golan D., Tashjian A. H., Armstrong E.. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Wolters Kluwer. 2011; 674-689
- [39] Huszno J., Nowara E. Farmakokinetyka i farmakogenetyka w systemowym leczeniu chorych na raka piersi. *Onkol Prak Klin.* 2010; 6(4): 159-170.
- [40] Farrell N. Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. *comprehensive coordination chemistry II.* Elsevier. 2003; 9: 809-847.
- [41] Rubach M. Objawy niepożądane chemioterapii (cz. 1). *Onk Dypl.* 2019. Internet: <https://podyplomie.pl/onkologia/33141,objawy-niepozadane-chemioterapii-cz-1> (pobrano 03 września 2022).
- [42] Potemski P., Czyżykowski R. Leczenie wspomagające. Neutropenia, *Onkol Prakt Klin Edu.* 2020; 6(3): 133-142.
- [43] Gramatyka M., Kardiotoxycychność jako niepożądane działanie w terapii raka piersi. *Postep Hig Med Dosw.* 2014; 68: 483-497.
- [44] Myśliwec P. Późne działania niepożądane leczenia uzupełniającego u chorych z rozpoznaniem raka piersi. *Lett Oncol Sci.* 2019; 16(1): 29-36.
- [45] Garrido-Castro A. C., Goel S. CDK4/6 inhibition in breast cancer: mechanisms of response and treatment failure. *Curr Breast Cancer Rep.* 2017; 9(1): 26-33.
- [46] Finn R.S., Crown J.P., Lang I. i wsp. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015; 16(1): 25-35.

- [47] Finn R.S., Martin M., Rugo H.S. i wsp. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375: 1925-1936.
- [48] Turner N. C., Slamon D. J., Ro J. i wsp. Overall survival with palbociclib and fulvestrant in advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 1926-1936.
- [49] Hortobagyi G.N., Stemmer S.M., Burris H.A. i wsp. Ribociclib as first-line therapy for hr-positive, advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375: 1738-1748.
- [50] Dickler M.N., Tolaney S.M. i wsp. MONARCH1: Results from a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as monotherapy, in patients with HR+/HER2- breast cancer, after chemotherapy for advanced disease. *J. Clin Oncol.* 2016; (34):15: 510-510
- [51] Sledge G., Toi M., Neven P. i wsp. MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2017; 35(25): 2875-2884.
- [52] Johnston S., Martin M., Di Leo A. i wsp. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *Breast Cancer.* 2019; 5: 1-5.
- [53] Xie J., Wang X., Proud Ch. G. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res.* 2016; 5: 1-5.
- [54] Kuc-Rajca M., Walaszowska-Czyż A. Nowe możliwości leczenia uogólnionego raka piersi. *Onco Review.* 2013; 3(1): 59-62.
- [55] Ewerolimus (everolimus). Indeks Leków MP. Internet: <https://indeks.mp.pl/desc.php?id=3706> (pobrano 03 września 2022).
- [56] Charakterystyka Produktu Leczniczego, Piqray. Aneks II. 2022.
- [57] André F., Ciruelos E., Rubovszky G. i wsp. Alpelisib for PIK3CA -mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2019; 380: 1929-1940.
- [58] Postępowanie w przypadku wystąpienia najczęstszych działań niepożądanych nowych inhibitorów kinazy tyrozynowej. *Onkologia MP.* Internet: <https://www.mp.pl/onkologia/artykuly/przegladowe/136975,postepowanie-w->

przypadku-wystapienia-najczestszych-dzialan-niepozadanych-nowych-inhibitorow-kinazy-tyrozynowej (pobrano 03 września 2022).

- [59] Montemurro F., Valabrega G., Aglietta M. Lapatinib: A dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase activity. *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7: 257-268.
- [60] Magiera M. Lapatinib - działania niepożądane. *Farm współcz.* 2017; 10: 84-90.
- [61] Conlon N.T., Kooijman J.J., van Gerwen S.J.C. i wsp. Comparative analysis of drug response and gene profiling of HER2-targeted tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2021, 124: 1249-1259.
- [62] Carter P., Presta L., Gorman C.M. i wsp. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 4285-4289
- [63] Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. i wsp. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001; 344: 783-792.
- [64] Perez E.A., Romond E.H., Suman V.J. i wsp. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 3366- 3373.
- [65] Perez E.A., Suman V.J., Davidson N.E. i wsp. Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011, 29: 4491-4497.
- [66] Gianni L., Dafni U., Gelber R.D. i wsp. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: A 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011; 12: 236-244.
- [67] Sosińska-Mielcarek K., Jassem J. Przeciwciała monoklonalne w leczeniu nowotworów litych. *Onkol Prakt Klin.* 2005; 1(4): 225-232.
- [68] Schmidt M., Wiskemann J., Steindorf K. Quality of life, problems, and needs of diseasefree breast cancer survivors 5 years after diagnosis. *Qual Life Res.* 2018; 27(8): 2077-2086.

- [69] Musgrove E.A., Sutherland R.L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(9): 631-643.
- [70] Gonzalez-Angulo A., Morales-Vasquez F., Hortobagyi G. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 608: 1-22.
- [71] Popęd M., Płuciennik E., Bednarek A. Białka w oporności wielolekowej nowotworów. *Post Hig Med Dosw*. 2014; 68: 614-630.
- [72] Marcinkowska M., Stańczyk M., Klajnert-Maculewicz B. Przeciwciała monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi. *Post Hig Med Dosw*. 2015; 69: 1313-1324.
- [73] Badowska-Kozakiewicz A. M. Zjawisko oporności wielolekowej w nowotworach - rola glikoproteiny P. *Życie Weterynaryjne*. 2011; 86(3): 211-214.
- [74] Kobańska M. Ryzyko nawrotu raka piersi może utrzymywać się 20 lat. *Onkologia. Termedia*. 2018. Internet: <https://www.termedia.pl/onkologia/Ryzyko-nawrotu-raka-piersi-moze-utrzymywac-sie-20-lat,29010.html> (pobrano 03 września 2022).
- [75] Cihan Y.B. Relationship of body mass index with prognosis in breast cancer patients treated with adjuvant radiotherapy and chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 4233-4238.
- [76] Arce-Salinas C., Aguilar-Ponce J.L., Villarreal-Garza C. i wsp. Overweight and obesity as a poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 146: 183-188.
- [77] Xing P., Li J.G., Zhao T.T. i wsp. Prognostic significance of body mass index in breast cancer patients with hormone receptor-positive tumours after curative surgery. *Clin Invest Med*. 2013; 36: 297-305.
- [78] Dobrek Ł., Szcześniak P., Thor P. Aktualne kierunki w poszukiwaniach nowych leków przeciwnowotworowych. *Geriatrics*. 2008; 2: 37-46.
- [79] Weissig V., Elbayoumi T., Flühmann B. i wsp. The growing field of nanomedicine and its relevance to pharmacy curricula. *Am J Pharm Educ*. 2021; 85(16): 800-803.
- [80] Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K. i wsp. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008, 5: 505-515.

- [81] Ranganathan R., Madanmohan S., Kesavan A. i wsp. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Inter J Nanomedicine*. 2012, 7: 1043-1060.
- [82] Patra J.K., Das G. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018; 16(71): 1-33.
- [83] LaVan D.A., McGuire T., Langer R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(10): 1184-1191.
- [84] Cavalcanti A., Shirinzadeh B., Freitas R.A. i wsp. Nanorobot architecture for medical target identification. *Nanotech*. 2008; 19(1): 1-15.
- [85] Dębek P., Feliczyk-Guzik A., Nowak I. Nanostruktury - ogólne informacje. Zastosowanie nanoobiektów w medycynie i kosmetologii. *Post Hig Med Dosw*. 2017, 71: 1055-1062.
- [86] Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. Zalecenie Komisji z dnia 18 października 2011 r. dotyczące definicji nanomateriału (2011/696/UE), str. 38-40.
- [87] Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T. i wsp. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Mol*. 2020; 25(1): 1-15.
- [88] Adair J.H., Parette M.P., Altinoglu E.I. i wsp. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS Nano*. 2010; 4(9): 4967-4970.
- [89] He L., Gu J., Lim L.Y. i wsp. Nanomedicine-mediated therapies to target breast cancer stem cells. *Front. Pharmacol*. 2016; 7(313): 1-13.
- [90] Tang X., Loc W. S., Dong C. i wsp. The use of nanoparticulates to treat breast cancer. *Nanomed*. 2017; 12(19): 2367-2388.
- [91] Szmit S., Filipiak K. J., Litwiniuk M. i wsp. Doksorubicyna liposomalna u chorych na raka piersi ze współistniejącymi chorobami sercowo-naczyniowymi - wielodyscyplinarne stanowisko ekspertów. *Onkol Prakt Klin Edu*. 2016, 2(3): 102-107.

- [92] Mayer L.D., Tai L.C., Bally M.B. i wsp. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1025: 143-151.
- [93] Marty M. Liposomal doxorubicin (Myocet™) and conventional anthracyclines: a comparison. *The Breast* 2001; Supl. 2: 28-33
- [94] Batist G., Ramakrishnan G., Rao C.S. i wsp. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 1444-1454.
- [95] Batist G., Harris L., Azarnia N. iI wsp. Improved anti-tumor response rate with decreased cardiotoxicity of non-pegylated liposomal doxorubicin compared with conventional doxorubicin in first-line treatment of metastatic breast cancer in patients who had received prior adjuvant doxorubicin: results of a retrospective analysis. *Anticancer Drug*. 2006; 17: 587-595.
- [96] Rommasi F., Esfandiari N. Liposomal Nanomedicine: Applications for drug delivery in cancer therapy. *Nanoscale Res Lett*. 2021; 16(1):95: 1-20.
- [97] Fujiwara Y., Mukai H., Saeki. i wsp. A multinational, randomised, open-label, parallel, phase III non-inferiority study comparing NK105 and paclitaxel in metastatic or recurrent breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2019; 120(5): 475-480.
- [98] Gadag S., Sinha S., Nayak Y. i wsp. Combination therapy and nanoparticulate systems: smart approaches for the effective treatment of breast cancer. *Pharm*. 2020; 12(6): 1-37.
- [99] NIH. ClinicalTrials.gov. Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (pobrano 03 września 2022).
- [100] He L., Gu J., Lim L. i wsp. Nanomedicine-mediated therapies to target breast cancer stem cells. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 1-13.
- [101] Kumar A., Gupta K., Dixit S. i wsp. A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture. *Int J Environ Sci Technol*. 2019; 16: 2175–2184.

- [102] Bobrowska-Korczak K., Gałtarek P., Skrajnowska D. Effect of zinc supplementation on the serum metabolites profile at the early stage of breast cancer in rats. *Nutrients*. 2020; 12 (3457): 1-14.
- [103] Boskabadi S. H., Balanezhad S. Z., Neamati A. i wsp. The green-synthesized zinc oxide nanoparticle as a novel natural apoptosis inducer in human breast (MCF7 and MDA-MB231) and colon (HT-29) cancer cells. *Inorg Nano Met Chem*. 2020; 51: 733-743.
- [104] Shandiz S. A. S., Sharifian F., Behboodi S. i wsp. Evaluation of metastasis suppressor genes expression and in vitro anti-cancer effects of zinc oxide nanoparticles in human breast cancer cell lines mcf-7 and t47d. *AJMB*. 2021; 13(1): 9-14.
- [105] Stepankova H., Swiatkowski M., Kruszynski R. i wsp. The anti-proliferative activity of coordination compound-based ZnO nanoparticles as a promising agent against triple negative breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2021; 1;16: 4431-4449.
- [106] Swanner J., Fahrenholtz C. D., Tenvooren I. i wp. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo. *Bioadv*. 2019; 1(10): 639-660.
- [107] Al-kawmani, A. A., Alanazi K. M., Farah M. i wsp. Apoptosis-inducing potential of biosynthesized silver nanoparticles in breast cancer cells. *J. King Saud*. 2020; 32(4): 2480-2488.
- [108] Wang D. P., Shen J., Qin C. Y. i wsp. Platinum nanoparticles promote breast cancer cell metastasis by disrupting endothelial barrier and inducing intravasation and extravasation. *Nano Res*. 2022; 15: 7366-7377.
- [109] Kim H., Jeon D., Oh S. i wsp. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis by interfering with EGFR signaling in human breast cancer cells. *Environ Res*. 2019; 175: 117-123.
- [110] Do M., Stinson K., George R. Reflectance structured illumination imaging of internalized cerium oxide nanoparticles modulating dose-dependent reactive oxygen species in breast cancer cells. *Biochem Biophys Rep*. 2020; 22: 1-9.
- [111] Sridharan. M., Kamaraj P., Arockiaselvi J. i wsp. Synthesis, characterization and evaluation of biosynthesized Cerium oxide nanoparticle for its anticancer activity on breast cancer cell (MCF 7). *Mater Today Proc*. 2021; 36: 914-919.

- [112] Hendi A. A., El-Nagar D. M., Awad M. A., i wsp. Green nanogold activity in experimental breast carcinoma in vivo. *Biosci Rep.* 2020; 40(11): 1-12.
- [113] Surapaneni S. K., Bashir S., Tikoo K. Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 1-12.
- [114] Mitra S., Dash R. Natural products for the management and prevention of breast cancer. *eCAM.* 2018; 26: 1-23.
- [115] Noel B., Singh S. K., Lillard J.W. i wsp. Role of natural compounds in preventing and treating breast cancer. *Front Biosci.* 2020; 12(1): 37-160.
- [116] Aung T.N., Qu Z., Kortschak R.D. i wsp. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3): 1-20.
- [117] Millimouno F.M., Dong J., Yang L. i wsp. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev Res.* 2014; 7(11): 1081-107.
- [118] Zhang L. X., Li C. X., Kakar M. U. i wsp. Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2021; 143: 1-20
- [119] Chin Y. T., Hsieh M. T., Yang S. H. i wsp. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget.* 2014; 5(24): 12891-12907.
- [120] Lee-Chang C., Bodogai M., Martin-Montalvo A. i wsp. Inhibition of breast cancer metastasis by resveratrol-mediated inactivation of tumor-evoked regulatory B cells. *J Immunol.* 2013; 191(8): 4141-4151.
- [121] Carter L.G., D'Orazio J. A., Pearson K. J. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer.* 2014; 21(3): 209-225.
- [122] Sprouse A.A., Herbert B.S. Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2014; 34(10): 5363-5374.

- [123] Shi Y., Yang S., Troup S. i wsp.. Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASPP1. *Oncol Rep.* 2011; 25(6): 1713-1719.
- [124] Khan A., Aljarbou A. N., Aldebasi Y. H. i wsp. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. *Cancer Epidemiol.* 2014; (6): 765-772.
- [125] Ronghe A., Chatterjee A., Bhat N. K. i wsp. Tamoxifen synergizes with 4-(E)-{(4-hydroxyphenylimino)-methylbenzene, 1,2-diol} and 4-(E)-{(p-tolylimino)-methylbenzene-1,2-diol}, novel azaresveratrol analogs, in inhibiting the proliferation of breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7(32): 51747-51762.
- [126] Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 57(13): 2889-2895.
- [127] Noel B., Singh S. K., Lillard J. W. i wsp. Role of natural compounds in preventing and treating breast cancer. *Front Biosci.* 2020; 12(1): 137-160.
- [128] Bimonte S., Barbieri A., Palma G. i wsp. Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breast cancer. *Biomed Res Int.* 2015; 878134: 1-8.
- [129] Li X., Xie W., Xie C. i wsp. Curcumin modulates miR-19/PTEN/AKT/p53 axis to suppress bisphenol A-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Phytother Res.* 2014; 28(10): 1553-1556.
- [130] Jung K. H., Lee J. H., Park J. W. i wsp. Targeted therapy of triple negative MDA-MB-468 breast cancer with curcumin delivered by epidermal growth factor-conjugated phospholipid nanoparticles. *Oncol Lett.* 2018; 15(6): 9093-9100.
- [131] Calaf G. M., Ponce-Cusi R., Abarca-Quinones J. Effect of curcumin on the cell surface markers CD44 and CD24 in breast cancer. *Oncol Rep.* 2018; 39(6): 2741-2748.
- [132] Lv Z. D., Liu X. P., Zhao W. J. i wsp. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(6): 2818-2824.
- [133] Mukherjee S., Mazumdar M., Chakraborty S. i wsp. Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/ β -catenin negative feedback loop. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5: 1-19.

- [134] Aghapour F., Moghadamnia A. A., Nicolini A. i wsp. Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 12: 860-865.
- [135] Li J., Zhu F., Lubet R. A. i wsp. Quercetin-3-methyl ether inhibits lapatinib-sensitive and -resistant breast cancer cell growth by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Mol. Carcinog.* 2013; 52: 134-143.
- [136] Manouchehri J. M., Turner K. A., Kalafatis M. TRAIL-induced apoptosis in TRAIL-resistant breast carcinoma through quercetin cotreatment. *Breast Cancer*, 2018; 15: 1-12.
- [137] Wang R., Yang L., Li S. i wsp. Quercetin inhibits breast cancer stem cells via downregulation of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), chemokine receptor type 4 (CXCR4), mucin 1 (MUC1), and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). *Med Sci Monit.* 2018; 21: 412-420.
- [138] Hu S.C., Yang J., Chen C. i wsp. Design, synthesis of novel tetrandrine-14-l-amino acid and tetrandrine-14-l-amino acid-urea derivatives as potential anti-cancer agents. *Molecules.* 2020; 25(7): 1-18.
- [139] Xu W., Debeb B. G., Lacerda L. i wsp. Tetrandrine, a compound common in chinese traditional medicine, preferentially kills breast cancer tumor initiating cells (TICs) In Vitro. *Cancers.* 2011; 3(2): 2274-2285.
- [140] Wong V. K. W., Zeng W., Chen J. i wsp. Tetrandrine, an activator of autophagy, induces autophagic cell death via PKC- α inhibition and mTOR-dependent mechanisms. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 1-13.
- [141] Jiang K, Wang W, Jin X i wsp. Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2015; 33(6), 2711-2718.
- [142] Kim S., Jeon M., Lee J. i wsp. Induction of fibronectin in response to epidermal growth factor is suppressed by silibinin through the inhibition of STAT3 in triple negative breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2014; 32(5): 2230 - 2235.

- [143] Kim T. H., Woo J. S., Kim Y. K. i wsp. Silibinin induces cell death through reactive oxygen species-dependent downregulation of notch-1/ERK/Akt signaling in human breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014; 349(2): 268 - 278.
- [144] Kil W. H., Kim S. M., Lee J. E. i wsp. Anticancer effect of silibinin on the xenograft model using MDA-MB-468 breast cancer cells. *Ann Surg Treat Res*. 2014; 87(4): 167-173.
- [145] Oh S. J., Jung S. P., Han J. i wsp. Silibinin inhibits TPA-induced cell migration and MMP-9 expression in thyroid and breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2013; 29(4): 1343 - 1348.
- [146] Bhattacharya S., Ahir M., Patra P. i wsp. PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a. *Biomaterials*. 2015; 51: 91-107.
- [147] Odeh F., Ismail S. I., Abu-Dahab R. i wsp. Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. *Drug Deliv*. 2012; 19(8): 371-377.
- [148] Woo C. C., Hsu A., Kumar A. P. i wsp. Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS. *PLoS One*. 2013; 8(10): 1-14.
- [149] Motaghd M., Al-Hassan F. M., Hamid S. S. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacognosy Res*. 201; 5(3): 200 -206.
- [150] Arafa el S. A., Zhu Q., Shah Z. I. i wsp. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat Res*. 2011; 706: 28 - 35.
- [151] Woodbury A., Yu S. P., Wei L. i wsp. Neuro-modulating effects of honokiol. *Front Neurol*. 2013; 4: 1-6.
- [152] Garcia A., Zheng Y., Zhao C. i wsp. Honokiol suppresses survival signals mediated by ras-dependent phospholipase D activity in human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(13): 4267 - 4274.

- [153] Hou W., Chen L., Yang G. i wsp. Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with adriamycin in breast cancer models. *Phytother Res.* 2008; 22(8): 1125 - 1132.
- [154] Wolf I., O'Kelly J., Wakimoto N. i wsp. Honokiol, a natural biphenyl, inhibits in vitro and in vivo growth of breast cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Int J Oncol.* 2007; 30(6): 1529-1537.
- [155] Avtanski D. B., Nagalingam A., Kuppusamy P. i wsp. Honokiol abrogates leptin-induced tumor progression by inhibiting Wnt1-MTA1-beta-catenin signaling axis in a microRNA-34a dependent manner. *Oncotarget.* 2015; 6(18): 16396 - 16410.
- [156] Park E. J., Min H. Y., Chung H. J. i wsp. Down-regulation of c-Src/EGFR-mediated signaling activation is involved in the honokiol-induced cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2009; 277(2): 133-140.
- [157] Sethi G., Shanmugam M. K., Warriar S. i wsp. Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin. *Nutrients.* 2018; 10(5): 1-12.
- [158] He Z., Chen H., Li G. i wsp. Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. *Phytomedicine.* 2014; 21(6): 871-876.
- [159] Kim E. A., Jang J. H., Lee Y. H. i wsp. Diosgenin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis.* 2014; 19(7): 1165-1175.
- [160] Chun J., Han L., Xu M. Y. i wsp. The induction of apoptosis by a newly synthesized diosgenyl saponin through the suppression of estrogen receptor-alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2014; 37: 1477-1486.
- [161] Jagadeesan J., Nandakumar N., Rengarajan T. i wsp. Diosgenin, a steroidal saponin, exhibits anticancer activity by attenuating lipid peroxidation via enhancing antioxidant defense system during NMU-induced breast carcinoma. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2012; 31(2): 121-129.
- [162] Srinivasan S., Koduru S., Kumar R. i wsp. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2009; 125(4): 961-967.

- [163] Saadat N. Gupta S. V. Potential role of garcinol as an anticancer agent. *J Oncol.* 2012; 1-9.
- [164] Ahmad A., Sarkar S. H., Bitar B. i wsp. Garcinol regulates EMT and Wnt signaling pathways in vitro and in vivo, leading to anticancer activity against breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(10): 2193 - 2201.
- [165] Ye X., Yuan L., Zhang L. i wsp. Garcinol, an acetyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of breast cancer cell line MCF-7 promoted by 17beta-estradiol. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(12): 5001-5007.
- [166] Chen C. S., Lee C. H., Hsieh C. D. i wsp. Nicotine-induced human breast cancer cell proliferation attenuated by garcinol through down-regulation of the nicotinic receptor and cyclin D3 proteins. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 125(1): 73-87.
- [167] Holzer T. R., McMaster W. R., Forney J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania Mexicana*. *Mol Biochem Parasitology.* 2006; 146(2): 198-218.
- [168] Trejo-Solís C., Pedraza-Chaverrí J., Torres-Ramos M. i wsp. Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 1-18.
- [169] Takeshima M., Ono M., Higuchi T. i wsp. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* 2014; 105(3): 252-257.
- [170] Peng S. J., Li J., Zhou Y. In vitro effects and mechanisms of lycopene in MCF-7 human breast cancer cells. *Genet Mol Res.* 2017; 16(2): 1-8.
- [171] Guo Q., Zhao B., Li M. i wsp. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes *Biochim Biophys Acta.* 1996; 3: 210-222.
- [172] Berner C., Aumüller E., Gnauck A. i wsp. Epigenetic control of estrogen receptor expression and tumor suppressor genes is modulated by bioactive food compounds. *Ann Nutr Metab.* 2011; 57: 183-189.

- [173] Nandakumar V., Vaid M., Katiyar S. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinog.* 2011; 32(4): 537-544.
- [174] Goodin M. G., Fertuck K. C., Zacharewski T. R i wsp. Estrogen receptor-mediated actions of polyphenolic catechins in vivo and in vitro. *Toxicol Sci.* 2002; 69(2): 354-361.
- [175] Wang P., Henning S. M., Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE.* 2010; 5(4): 1-10.
- [176] Peng G., Dixon D. A., Muga S. J. i wsp. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2006; 45(5): 309-319.
- [177] Chun K. S., Surh Y. J. Cancer Chemoprevention Targeting COX-2 using Dietary Phytochemicals. *Cancer Inflamm Mech.* 2014; 339-353.
- [178] Zhang G., Wang Y., Zhang Y. i wsp. Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy. *Curr Mol Med.* 2012; 12(2): 163-176.
- [179] Alcaraz M., Armero D., Martínez-Beneyto Y. i wsp. Chemical genoprotection: Reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2011; 40(5): 310-314.
- [180] Cheung K. L., Kong A. N. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J.* 2010; 12(1): 87-97.
- [181] Pledge-Tracy A., Sobolewski M. D. Davidson N. E. i wsp. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(3): 1013-1021.
- [182] Li Y., Meeran S. M., Tollefsbol T. O. Combinatorial bioactive botanicals re-sensitize tamoxifen treatment in ER-negative breast cancer via epigenetic reactivation of ER α expression. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1-15.

- [183] Li Y., Yuan Y. Y., Meeran S. M. i wsp. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2010; 9: 1-12.
- [184] Meeran S. M., Patel S. N., Tollefsbol T. O. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS ONE*. 2010; 5: 1-13.
- [185] Sharifi-Rad J., Quispe C., Imran M. i wsp. Genistein: an integrative overview of its mode of action, pharmacological properties, and health benefits. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 19: 1-36.
- [186] Radzikowski C., Wietrzyk J., Gryniewicz G. i wsp. Genisteina - izoflawonoid soi o różnicowanym mechanizmie działania - implikacje kliniczne w leczeniu i prewencji chorób nowotworowych. *Post Hig Med Dośw*. 2004; 58: 128-139.
- [187] Kołodziejczyk J., Olas B., Wachowicz B. Właściwości lecznicze izoflawonów w łagodzeniu objawów towarzyszących menopauzie i nie tylko. *Kosmos*. 2012; 61(2): 331-339.
- [188] Maliszewska M. Genisteina i 3,3'-diindolilometan w chemoprewencji nowotworów. *Post Fit*. 2013; 4: 248-255.
- [189] Rothwell J. A., Day A. J., Morgan M.R. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(11): 4355-4360.
- [190] Wu J. G., Ge J. Zhang Y. P. i wsp. Solubility of genistein in water, methanol, ethanol, propan-2-ol, 1-butanol, and ethyl acetate from (280 to 333) K. *J Chem Eng*. 2010; 55: 5286-5288.
- [191] Hur H. G. Jr Lay J. O., Beger R. D. i wsp. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*. 2000; 174(6): 422-428.
- [192] Kwon S. H., Kang M. J., Huh J. S. Comparison of oral bioavailability of genistein and genistin in rats. *Int J Pharm*. 2007; 337: 148-154.
- [193] Halm B. M., Franke A. A., Ashburn L. A. i wsp. Oral antibiotics decrease urinary isoflavonoid excretion in children after soy consumption. *Nutr Cancer*. 2008; 60(1): 14-22.

- [194] Prescha A., Biernat J. Wpływ fitoestrogenów pokarmowych na organizm człowieka. Cz. II. Przeciwdziałanie skutkom menopauzy oraz działanie przeciwnowotworowe. *Bromat Chem Toksykol.* 2008; 4: 941-948.
- [195] Nagata C., Shimizu H., Takami R. i wsp. Soy product intake and hot flashes in Japanese women. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(8): 790-793.
- [196] Murkies A. L., Lombard C., Strauss B. J. i wsp. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flashes: effect of soy and wheat. *Maturitas.* 2008; 61: 27-33.
- [197] Bijak M., połać I., Borowiecka M. Izoflawony jako alternatywa dla terapii hormonalnej wieku menopauzalnego. *Przegląd Menopauzalny.* 2010; 6: 402-406.
- [198] Bolego C., Poli A., Cignarella A. Phytoestrogens: pharmacological and therapeutic perspectives. *Curr Drug Targets.* 2003; 4: 77-87.
- [199] Cassidy A., Albertazzi P., Nielsen I. L. i wsp. Critical review of health effects of soybean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Society.* 2006; 65: 76-92.
- [200] Crisafulli A., Altavilla D., Marini H. i wsp. Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Menopause.* 2005; 12: 186-192.
- [201] Duffy R., Wiseman H., File S. E. Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75: 721-729.
- [202] Pierzynowska K., Cyske Z., Gaffke L. i wsp. Potencjał autofagii indukowanej przez genisteinę w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. *Post Biochem.* 2021; 67(2): 117-129.
- [203] Smolińska E., Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J. i wsp. Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT. *PLoS One.* 2018; 13(2): 1-27.
- [204] Das B., Tandon V., Saha N. Genistein from *Flemingia vestita* (Fabaceae) enhances NO and its mediator (cGMP) production in a cestode parasite, *Raillietina echinobothrida*. *Parasitology.* 2007; 134: 1457-1463.

- [205] Pons D.G., Vilanova-Llompart J., Gaya-Bover A. i wsp. The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ER_α/ER_β ratio in breast cancer cells. *Int J Food Sci Nutr.* 2019; 70: 941-949.
- [206] Pan H., Zhou W., He W. i wsp. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- κ B activity via the Notch-1 pathway. *Int J Mol Med.* 2012; 30: 337-343.
- [207] Chen W. F., Huang M. H., Tzang C. H. i wsp. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2003; 1638: 187-196.
- [208] Chinni S. R., Alhasan S. A., Multani A.S. i wsp. Pleotropic effects of genistein on MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12: 29-34.
- [209] Jiang H., Fan J., Cheng L. i wsp. The anticancer activity of genistein is increased in estrogen receptor beta 1-positive breast cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2018; 11: 8153-8163.
- [210] Lavigne J. A., Takahashi Y., Chandramouli G.V.R. i wsp. Concentration-dependent effects of genistein on global gene expression in MCF-7 breast cancer cells: An oligo-microarray study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 110: 85-98.
- [211] Mukund V., Saddala M.S., Farran B. i wsp. Molecular docking studies of angiogenesis target protein HIF-1 and genistein in breast cancer. *Gene* 2019; 701: 169-172.
- [212] Rajah T.T., Du N., Drews N. i wsp. Genistein in the presence of 17-estradiol inhibits proliferation of ER breast cancer cells. *Pharmacol.* 2009; 84: 68-73.
- [213] Santell, R. C., Kieu N., Helferich W.G. Genistein inhibits growth of estrogen independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr* 2000; 130: 1665-1669.
- [214] Li Z., Li J., Mo B. i wsp. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol Vitro.* 2008; 22: 1749-1753.
- [215] Atteritano M., Pernice F., Mazzaferro S. i wsp. Effects of phytoestrogen genistein on cytogenetic biomarkers in postmenopausal women: 1 year randomized, placebo-controlled study. *Eur J Pharmacol.* 2008; 589: 22-26.

- [216] De La Parra C., Castillo-Pichardo L., Cruz-Collazo A. i wsp. Soy isoflavone genistein-mediated downregulation of miR-155 contributes to the anticancer effects of genistein. *Nutr Cancer*. 2016; 68: 154-164.
- [217] Donovan M. G., Selmin O. I., Doetschman T.C. i wsp. Epigenetic activation of BRCA1 by genistein in vivo and triple negative breast cancer cells linked to antagonism toward aryl hydrocarbon receptor. *Nutrients*. 2019; 11: 1-19.
- [218] Nadal-Serrano M., Pons D. G., Sastre-Serra J. i wsp. Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ERa/ER ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45: 2045-2051.
- [219] Balabhadrapathruni S., Thomas T. J., Yurkow E. J. i wsp. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2000; 7: 3-12.
- [220] Voelcker G., Pfeiffer B., Schnee A. i wsp. Increased antitumour activity of mesyl-I-aldophosphamide-perhydrothiazine, in vivo but not in vitro, compared to I-aldophosphamide-perhydrothiazine. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000; 126: 74-78.
- [221] Mai Z.; Blackburn G. L., Zhou J. R i wsp. Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Mol Carcinog*. 2007; 46: 534-542.
- [222] Katdare M., Osborne M., Telang N. T. i wsp. Soy isoflavone genistein modulates cell cycle progression and induces apoptosis in HER-2/neu oncogene expressing human breast epithelial cells. *Int J Oncol*. 2002; 2: 809-815.
- [223] Sharma S. V., Haber D. A. Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 241-253.
- [224] Chen J., Duan Y., Zhang X. i wsp. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Funct*. 2015; 6: 995-1000.

- [225] Sohel M., Biswas P., Al Amin M. i wsp. Genistein, a potential phytochemical against breast cancer treatment-insight into the molecular mechanisms. *Processes*. 2022; 10(2): 1-22.
- [226] Kang X., Zhang Q., Wang S. i wsp. Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. *CMAJ*. 2010; 182(17): 1857-1862.
- [227] Cho Y. A., Kim J., Park K. S. i wsp. Effect of dietary soy intake on breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64(9): 924-932.
- [228] Mc Michael-Phillips D. F., Harding C., Morton M. i wsp. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68(6): 1431-1435.
- [229] Shike M., Doane A. S., Russo L. i wsp. The effects of soy supplementation on gene expression in breast cancer: a randomized placebo-controlled study. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106(9): 1-12.
- [230] Ju Y. H., Allred K. F., Allred C. D., Helferich W. G. Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinog*. 2006; 27(6): 1292-1299.
- [231] Nikov G. N., Hopkins N. E., Boue S. i wsp. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(9): 867-872.
- [232] Barnes S., Kim H., Darley-Usmar V. i wsp. Beyond ERalpha and ERbeta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J Nutr*. 2000; 130: 656-657.
- [233] Dhama K., Latheef S. K., Dadar M. i wsp. Biomarkers in stress related diseases/disorders: diagnostic, prognostic, and therapeutic values. *Front Mol Biosci*. 2019; (6):91: 1-50.
- [234] Falasca M. Cancer biomarkers: the future challenge of cancer. *J Mol Biomark Diagn*. 2012; 2: 1-1.
- [235] Bhatt A. N., Mathur R., Farooque A. i wsp. Cancer biomarkers — current perspectives. *Indian J Med Res*. 2010; 132: 129-149.

- [236] Song N., Sung H., Choi J. Y. i wsp. Preoperative serum levels of matrix metalloproteinase - 2 (MMP-2) and survival of breast cancer among Korean women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21: 1371-1380.
- [237] Malone K. E., Daling J. R., Doody D. R. i wsp. Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. *Cancer Res* 2006; 66: 8297-8308.
- [238] Ślubowski, T., Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi Część I: receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny. *Współcz Onkol.* 2007; 11(4): 167-174.
- [239] Thomadaki H., Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 1-67.
- [240] Davis L. M., Harris C., Tang L. i wsp. Amplification patterns of three genomic regions predict distant recurrence in breast carcinoma. *J Mol Diagn* 2007; 9: 327-336.
- [241] Walaszczyk A., Gabryś D. Markery molekularne stosowane w diagnostyce raka piersi - obecna praktyka kliniczna i perspektywy rozwoju. *Nowotwory.* 2018; 3(5-6): 306-314.
- [242] Duffy M. J., Walsh S., McDermott E. W. i wsp. Biomarkers in breast cancer: where are we and where are we going? *Adv Clin Chem.* 2015; 71: 1-23.
- [243] Pietrowska M., Marczak L., Polanska J. i wsp. Mass spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. *J Transl Med.* 2009; 7:60: 1-13.
- [244] Hadi N. I., Jamal Q. "OMIC" tumor markers for breast cancer. *Pak J Med Sci.* 2015; 31: 1256-1262.
- [245] Swellam M., Soliman H. A., Abdelmaksoud M. D. i wsp. Clinical implications of proteolytic activity imbalance in breast cancer diagnosis. *Cancer Biomark.* 2014; 14: 409-417.
- [246] Fang W. B., Jokar I., Zou A i wsp. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2012; 287: 36593-36608.

- [247] Li M., Knight D. A., Snyder L. i wsp. A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance. *Onco immuno*. 2013; 2: 1-9.
- [248] Zhang M., Wang Y., Wang Y. i wsp. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression to determine specific diagnostic biomarkers and prognostic biomarkers of breast cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 1-16.
- [249] Aoki M. N., Amarante M. K., Oda J. M. i wsp. Caveolin involvement and modulation in breast cancer. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11: 1143-1152.
- [250] Molina A., Velot L., Ghoinem L. i wsp. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer*. 2013; 73: 2905-2915.
- [251] Rodrigues-Ferreira S., Di Tommaso A., Dimitrov A. i wsp. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One*. 2009; 4: 1-11
- [252] Tan B., Zhang Y., Zhang T. i wsp. Identifying potential serum biomarkers of breast cancer through targeted free fatty acid profiles screening based on a GC-MS platform. *Biomed Chromatogr*. 2020; 34(10): 1-10.
- [253] Takimoto C. H., Glover K., Huang X. i wsp. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of unconjugated soy isoflavones administered to individuals with cancer. *Cancer Epidem Biomark Prev*. 2003; 12(11): 1213-1221.
- [254] Raćkowska E., Bobrowska-Korczak B., Giebułtowicz J. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019; 1128: 1-8.
- [255] Stawarska A., Czerwonka M., Wyrębiak R. i wsp. Zinc Affects Cholesterol Oxidation Products and Fatty Acids Composition in Rats' Serum. *Nutrients*. 2021; 13(5): 1-13.
- [256] Muto M., Kubota C., Tanaka M. i wsp. Identification and functional analysis of delta-9 desaturase, a key enzyme in PUFA Synthesis, isolated from the oleaginous diatom *Fistulifera*. *PLoS One*. 2013; 8(9) 1-7.

- [257] Paszczyk B., Łuczyńska, J. Fatty acids profile, conjugated linoleic acid contents and at quality in selected dairy products available on the Polish market. *Czech J Food Sci.* 2020; 38(2): 109-114.
- [258] Fernandez M., Antonio Ordonez J., Cambero I. i wsp. Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry.* 2007; 101(1): 107-112.
- [259] Frohberg P., Drutkowski G., Wobst I. Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41(4): 1317-1324.
- [260] Piłat D., Mika J. Rola cytokin z rodziny interleukiny-1 w transmisji nocyceptywnej. *Ból.* 2014; 15(4): 39-47.
- [261] Karlikowska-Skwarnik M. Powiększenie śledziony (splenomegalia): przyczyny, objawy i leczenie. *Medycyna Praktyczna.* Internet: <https://www.mp.pl/pacjent/objawy/170516,powiekszenie-sledziony> (pobrano 09 września 2022).
- [262] Gajewski K. Powiększenie wątroby. *Medycyna Praktyczna.* Internet: <https://www.mp.pl/pacjent/objawy/133400,powiekszenie-watroby> (pobrano 09 września 2022).
- [263] Ju Y. H., Allred C. D., Allred K. F. i wsp. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen- dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr.* 2001; 131(11): 2957-2962.
- [264] Kanwal R., Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012; 81(4): 303-311.
- [265] Feinberg A P. Cancer epigenetics takes center stage. *PNAS.* 2001; 98(2): 392-394.
- [266] Winter P.C., Hickey G., Fletcher H. Epigenetyka i modyfikacje chromatyny. *Krótkie wykłady Genetyka.* Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2003; 374-381.
- [267] Krakowczyk Ł., Strzelczyk J. K. Epigenetic modification of gene expression in colorectal carcinogenesis. *Współcz Onkol.* 2007; 11: 289-294.

- [268] Ducasse M., Brown M.A. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006; 5(60): 1-10.
- [269] Kanwal R., Gupta S. Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol*. 2010; 109: 598-605.
- [270] Toraño E. G., García M. G., Fernández-Morera J. L. i wsp. The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *Biomed Res Int*. 2016; 1-18.
- [271] Cheung H. H., Lee T. L., Rennert O. M i wsp. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2009; 87(4): 335-350.
- [272] Lopez-Serra P., Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene*. 2011; 16: 1-14.
- [273] Braybrooke J. P., Houlbrook S., Crawley J. E. i wsp. Evaluation of the alkaline comet assay and urinary 3-methyladenine excretion for monitoring DNA damage in melanoma patients treated with dacarbazine and tamoxifen. *Cancer Chemoth Pharmacol*. 2000; 45: 111-119.
- [274] Loft S., Svoboda P., Kasai H. i wsp. Prospective study of urinary excretion of 7-methylguanine and the risk of lung cancer: Effect modification by mu class glutathione-S-transferases. *Int J Cance*. 2007; 121: 1579-1584.
- [275] Porcelli B., Muraca L. F., Frosi B. i wsp. Fast-atom bombardment mass spectrometry for mapping of endogenous methylated purine bases in urine extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1997; 11(4): 398-404.
- [276] Park J. W., Ames B. N-7-methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: analysis by HPCL with electrochemical detection. *PNAS*. 1988; 85(20): 7467-7470.
- [277] Seidel A., Brunner S., Seidel P. i wsp. Modified nucleosides: An accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *Br J Cancer*. 2006; 94(11): 1726-1733.
- [278] Hsu W. Y., Chen C. J., Huang Y.C. i wsp. Urinary nucleosides as biomarkers of breast, colon, lung, and gastric cancer in Taiwanese. *PLoS One*. 2013; 8(12): 1-8.

- [279] Tebib J. G., Reynaud C., Cedoz J. P. i wsp. Relationship between urinary excretion of modified nucleosides and rheumatoid arthritis process. *Br J Rheumatol.* 1997; 36(9): 990-995.
- [280] Luo Y., Yao Y., Wu P. i wsp. The potential role of N7-methylguanosine (m7G) in cancer. *J Hematol Oncol.* 2022; (19):63: 1-14.
- [281] Cho S. H., Jung B. H., Lee S. H. i wsp. Direct determination of nucleosides in the urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(11): 1229-1236.
- [282] Bobrowska-Korczak B., Domańska K., Skrajnowska D. i wsp. Nanosized zinc, epigenetic changes and its relationship with DMBA induced breast cancer in rats. *Rev Analyt Chem.* 2020; 39: 200-208.
- [283] Shen Ch., Wang K., Deng X. i wsp. DNA N6-methyldeoxyadenosine in mammals and human disease. *Trends in Genetics.* 2022; 38(5): 454-467.
- [284] Romanowicz-Makowska H., Smolarz B., Makowski M. i wsp. Znaczenie mechanizmów naprawy DNA w procesie transformacji nowotworowej u kobiet w okresie menopauzy. *Przegląd Menopauzalny* 2009; 1: 26-32.
- [285] Thomas B., Matson S., Chopra V. i wsp. A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. *Anal Biochem.* 2013; 15: 436(2): 112-120.
- [286] Merck. N6-Methyl-2'-deoxyadenosine. 2002. Internet: <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma> (pobrano 09 września 2022).
- [287] Vold B. Modified nucleosides of *Bacillus subtilis* transfer ribonucleic acids. *J Bacteriol.* 1976; 127(1): 258-267.
- [288] Chujo T., Suzuki T. Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs. *RNA.* 2012; 18(12): 2269-2276.
- [289] Reynaud C., Bruno C., Boullanger P. i wsp. Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies. *Cancer Lett.* 1991; 255-262.

- [290] Szlasa W., Zendran I., Zalesińska A. i wsp. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 2020; 52(5): 321-342.
- [291] Ye C. Q. Tu B. P. Sink into the epigenome: histones as repositories that influence cellular metabolism. *Trends Endocrin Met.* 2018; 29: 626-637.
- [292] Stawarska A., Jelińska M., Czaja J. i wsp. Oils' impact on comprehensive fatty acid analysis and their metabolites in rats. *Nutr.* 2020; 12: 1-20.
- [293] Calder P.C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *j. parenter enter. Nutr.* 2015; 39: 18-32.
- [294] Vander Heiden M. G., Cantley L. C., Thompson C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Sci.* 2009; 324: 1029-1033.
- [295] Przybojewska B., Rafalski H. Kwasy tłuszczowe występujące w mleku a zdrowie człowieka. Krótkołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe SCFA. *Przeł Mlecz.* 2003; 4: 148-151.
- [296] Gumiela D. Rola kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w patogenezie i dietoterapii reumatoidalnego stawów. *Post Diet Geriatr.* 2017; 2(3): 23-30.
- [297] Mess E., Ornat M., Sławomirska R. Rola tłuszczów w chorobach onkologicznych. *Med Pal.* 2017; 9(4): 191-203.
- [298] Luo H., Chen C. Y., Li X. i wsp. Increased lipogenesis is critical for self-renewal and growth of breast cancer stem cells: Impact of omega-3 fatty acids. *Stem Cells.* 2021; 39(12): 1660-1670.
- [299] Lope V., Guerrero-Zotano A., Casas A. Serum phospholipids fatty acids and breast cancer risk by pathological subtype. *Nutrients.* 2020; 3132(12): 1-19.
- [300] Mirowski A., Jachnis A. Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 a choroby nowotworowe. *Życie Weterynaryjne.* 2018; 93(1): 20-21.
- [301] Bao To N., Nguyen Y. T. K., Moon J.Y. i wsp. Pentadecanoic acid, an odd-chain fatty acid, suppresses the stemness of MCF-7/SC human breast cancer stem-like cells through JAK2/STAT3 signaling. *Nutr.* 2020; 12: 1-20.

- [302] Ferreri C., Sansone A., Chatgialloglu Ch. i wsp. Critical review on fatty acid-based food and nutraceuticals as supporting therapy in cancer. *Int J Mo. Sci.* 2022; 23(11): 1-21.
- [303] Miryaghoubzadeh J., Darabi M., Madaen K. i wsp. Tissue fatty acid composition in human urothelial carcinoma. *Br J Biomed Sci.* 2013; 70(1): 1-5.
- [304] Wang S., Wu D., Matthan N. R. i wsp. Reduction in dietary omega-6 poly-unsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis.* 2009; 204: 147-155.
- [305] Chen Z., Yu R., Xiong Y. i wsp. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2017; 16: 1-9.
- [306] Yun J. M., Surh J. Fatty acid composition as a predictor for the oxidation stability of Korean vegetable oils with or without induced oxidative stress. *Prev Nutr Food Sci.* 2012; 17: 158-165.
- [307] Byberg L., Kilander L., Warensjö Lemming E. i wsp. Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99(3): 551-558.
- [308] Azrad M., Turgeon C., Demark-Wahnefried W. Current evidence linking polyunsaturated fatty acids with cancer risk and progression. *Front. Oncol.* 2013; 3: 1-12.
- [309] Sommer E., Sommer S., Skopińska-Różewska E. Nienasycone kwasy tłuszczowe, a nowotworzenie. *Współcz Onkol.* 2002; 6: 60-63.
- [310] Pang L., Shah H., Xu Y. i wsp. Delta-5-desaturase: A novel therapeutic target for cancer management. *Transl Oncol.* 2021; 14(11): 1-11.
- [311] Lunn J., Theobald H. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr.* 2006; 31: 178-224.
- [312] Francuz T., Czajka-Francuz P., Cisoń-Juek S. i wsp. Rola zapalenia w patogenezie raka jelita grubego. *Post Hig Med Dosw.* 2016; 70: 360-366.

- [313] Greene E. R., Huang S., Serhan C. N. i wsp. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011; 96(1-4): 27-36.
- [314] Calder P. C. Eicosanoids. *Essays Biochem.* 2020; 64(3): 423-441.
- [315] Banaszczak M., Stachowska E. Patogeneza NAFLD w świetle wyników najnowszych badań. *Post Biochemii.* 2017; 63(3): 190-197.
- [316] Klawitter J., Zafar I., Klawitter J. i wsp. Effects of lovastatin treatment on the metabolic distributions in the Han: SPRD rat model of polycystic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2013; 14: 1-10.
- [317] Vang K., Ziboh V. 15-Lipoxygenase metabolites of γ -linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: Possible implications of dietary fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 72(5): 363-372.
- [318] Tavakoli-Yaraki M., Karami-Tehrani F. Apoptosis Induced by 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid in the breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(4): 653-659.
- [319] Kelavkar U., Glasgow W., Eling T. E. The effect of 15-lipoxygenase-1 expression on cancer cells. *Curr Urol Rep.* 2002; 3(3): 207-214.
- [320] Jiang W. G., Watkins G., Douglas-Jones A. i wsp. Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006; 74(4): 235-245.
- [321] Vaezi M. A., Safizadeh B., Eghtedari A. R. i wsp. 15-Lipoxygenase and its metabolites in the pathogenesis of breast cancer: A double-edged sword. *Lipids Health Dis.* 2021; 20: 1-19.
- [322] Larsson S. C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M. i wsp. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(6): 935-045.
- [323] Mahesha H. G., Singh S. A., Rao A. G. Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: evidence of isoflavones as redox inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 15(2): 176-185.

- [324] Chechlińska M. Rola cytokin w procesach nowotworzenia. *J Oncol.* 2003; 53: 648-659.
- [325] Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M. Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Pol Arch Med Wew.* 2007; 117: 247-251.
- [326] Metrowska P., Metrowski S., Smarz-Widelska I. i wsp. Biological role, mechanism of action and the importance of interleukins in kidney diseases. In *J Mol Sci.* 2022; 23(647): 1-29.
- [327] Wu T. C., Xu K., Martinek J. I wsp. IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2018; 1-5.
- [328] Dinarello C. A. An interleukin-1 signature in breast cancer treated with interleukin-1 receptor blockade: implications for treating cytokine release syndrome of checkpoint inhibitors. *Cancer Res.* 2018; 78: 5200-5202.
- [329] Kozłowski L., Zakrzewska I., Tokajuk P. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst.* 2003; 48: 82-84.
- [330] Gelfo V., Romaniello D., Mazzeschi M. i wsp. Roles of IL-1 in cancer: from tumor progression to resistance to targeted therapies. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 1-14
- [331] Shibayama O., Yoshiuchi K., Inagaki M. i wsp. Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer Med.* 2014; 3: 702-709.
- [332] Tang S. Ch., Hsiao Y. P., Ko J. L. Genistein protects against ultraviolet B- induced wrinkling and photoinflammation in in vitro and in vivo models. *Genes Nutr.* 2022; 17(4): 1-14.
- [333] Lee S. R., Kwon S. W., Lee Y. H. i wsp. Dietary intake of genistein suppresses hepatocellular carcinoma through AMPK-mediated apoptosis and anti-inflammation. *BMC Cancer.* 2019; 19(6): 1-12.
- [334] Pierzynowska K., Podlacha M., Brokowska J. i wsp. Molekularne mechanizmy działania genisteiny w świetle terapii chorób genetycznych i immunologicznych. *Post Biochem.* 2018; 64(4): 262-275.

- [335] Kołaczowska E. Metaloproteinaza 9 (MMP-9) jako szczególny przedstawiciel metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej: rola w napływie i apoptozie neutrofilii w trakcie reakcji zapalnej. *Post Biol Kom.* 2010; 37(2): 471-499.
- [336] Zaręba I., Donejko M., Rysiak E. Znaczenie i przydatność diagnostyczna metaloproteinaz w raku piersi. *Nowotwory. J Oncol*, 2014; 64(6): 491-495.

VIII. STRESZCZENIE

1. Streszczenie w języku polskim

WSTĘP

W poszukiwaniu związków o działaniu przeciwnowotworowym dużą uwagę zwraca się na badania dotyczące genisteiny. Wykazano, że genisteina może wykazywać działanie przeciwnowotworowe m.in. poprzez indukowanie apoptozy, wpływ na cykl komórkowy, hamowanie procesu angiogenezy, aktywność antyproliferacyjną. Z drugiej strony istnieją dane potwierdzające pronowotworowe działanie genisteiny, szczególnie w typach nowotworów hormonozależnych. W związku z powyższym nadal nie wiemy komu, w jakich dawkach należy podawać genisteinę, aby osiągnąć pożądany efekt zdrowotny, do końca nieznany jest mechanizm jej działania na etapie inicjacji i progresji procesu nowotworowego. Istotna jest również odpowiedź na pytanie czy stosowanie suplementów zawierających genisteinę w kontekście ryzyka rozwoju choroby nowotworowej, jest dla kobiet bezpieczne. Kolejnym ważnym aspektem jest odpowiedź na pytanie w jaki sposób będzie działała genisteina w formach mikro i nano? Nanocząstki wykazują inną aktywność fizyczną, chemiczną i biologiczną niż makrocząstki. Należy zaznaczyć, że w piśmiennictwie wciąż brakuje badań z przedstawionego zakresu.

CEL PRACY

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu genisteiny w formach nano, mikro i makro na intensywność przebiegu procesu nowotworowego indukowanego 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem u szczurów oraz poznanie mechanizmów tego działania. Dokonano oceny wpływu genisteiny na kinetykę zmian zawartości 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, O-metyloguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu szczurów w warunkach procesu nowotworowego. Oznaczono zawartość kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów. Dokonano oceny wpływu genisteiny na aktywność $\Delta 6$ -desaturazy oraz $\Delta 5$ -desaturazy oraz stopień aterogenności i trombogenności kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów. Zbadano wpływ nano, mikro i makrogenisteiny na zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych, kwasów hydroksyoktadekadienowych oraz kwasu 12-hydroksyeikozapentaenowego, jak

również zawartość interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 1 (IL-1) oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9) w surowicy krwi szczurów.

MATERIAŁ I METODYKA

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 (*adenocarcinoma*), szczurom podano sondą dożołądkową (DMBA). Do przeprowadzenia badań zastosowano następujące techniki analityczne: chromatografię cieczową z detekcją spektrometrii mas, chromatografię gazową z z detekcją spektrometrii mas, metody immunoenzymatyczne, chromatografię cieczową z detekcją UV, oraz metodę spektrofotometryczną.

WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że suplementacja zwierząt genisteiną w formie makro, mikro i nano spowodowała wzrost intensywności przebiegu procesu nowotworowego u szczurów. Nanogenisteina stymulowała inicjację procesu nowotworowego, powodowała stymulację wzrostu guzów. Makro i mikrogenisteina powodowała wzrost intensywności proliferacji komórek nowotworowych. Skutkiem suplementacji zwierząt genisteiną był wzrost zawartości 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, 1-metyloguaniny, 1-metyloadenozyny, 7-metyloguanozyny, O-metyloguanozyny, N6-metylo-2'-deoksyguanozyny w moczu szczurów w warunkach procesu nowotworowego. Suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną wpływa zarówno na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych, jak również profil kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA. Zwierzęta suplementowane mikro i nanogenisteiną charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą zawartością kwasów: pentadekanowego, heptadekanowego,

palmitooleinowego, heksadecenowego, wakcenenowego oraz kwasów linolowego, gamma-linolenowego i arachidonowego, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Wykazano istotnie statystycznie wyższą zawartość zarówno jednonienasyconych, jak i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (wartość sumaryczna) w surowicy krwi zwierząt suplementowanych mikro i nanogenisteiną, w odniesieniu do zwierząt otrzymujących wyłącznie dietę standardową (pozbawionych suplementacji). Wykazano istotnie statystycznie niższą zawartość 12-HEPE, HODE oraz 12-HETE w surowicy krwi szczurów suplementowanych genisteiną, w odniesieniu do zawartości w/w markerów w surowicy krwi szczurów otrzymujących wyłącznie dietę standardową, pozbawionych suplementacji.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że suplementacja zwierząt nano, mikro i makrogenisteiną miała 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.

2. Streszczenie w języku angielskim

INTRODUCTION

In the search for compounds with anti-cancer effects, research on genistein has received considerable attention. It has been shown that genistein can exhibit anticancer effects by, among other things, inducing apoptosis, affecting the cell cycle, inhibiting angiogenesis, and antiproliferative activity. On the other hand, there are data supporting the pro-cancerous effect of genistein, especially in hormone-dependent cancer types. In view of the above, we still do not know to whom, in what doses genistein should be administered to achieve the desired health effect, the mechanism of its action at the stage of initiation and progression of the cancer process is still unknown to the end. It is also important to answer the question of whether it is safe for women to use supplements containing genistein in the context of cancer risk. Another important

aspect is the answer to the question of how genistein in micro and nano forms will work? Nanoparticles exhibit different physical, chemical and biological activity than macro compounds. It should be noted that there is still a lack of research in the literature in the field presented.

AIM

The aim of this study was to evaluate the effect of genistein in nano, micro and macro forms on the intensity of 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene-induced tumorigenesis in rats and to understand the mechanisms of this effect. The effect of genistein on the kinetics of changes in the content of 3-methyladenine, 7-methylguanine, 1-methylguanine, 1-methyladenosine, 7-methylguanosine, O-methylguanosine, N⁶-methyl-2'-deoxyguanosine in the urine of rats under the conditions of the tumor process was evaluated. The content of fatty acids in the blood serum of rats was determined. The effect of genistein on the activity of Δ 6-desaturase and Δ 5-desaturase and the degree of atherogenicity and thrombogenicity of fatty acids in rat serum was evaluated. The effects of nano-, micro- and macro-genistein on the content of 5-, 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic acids, hydroxyoctadecadienoic acids and 12-hydroxyeicosapentaenoic acid, as well as the content of interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 (IL-1) and metalloproteinase 9 (MMP-9) in rat serum were investigated.

MATERIAL AND METHODOLOGY

The biological material for the study was urine, blood serum and tumors obtained from female rats of the Sprague-Dawley strain (n=32). After a 10-day period of adaptation to the conditions of the experiment, the animals were randomly divided into 4 groups: unsupplemented animals, animals supplemented at a dose of 0.2 mg/kg b.w. with macro, micro (587±83 nm), or nano (92±41 nm) genistein. The genistein, suspended in 0.4 ml of water, was administered to the animals via an intragastric probe from the 40th day of life to the 20th week of life of the rats. To maintain experimental conditions, animals in the control group received 0.4 ml of water via an intragastric probe. To induce mammary neoplasia (adenocarcinoma), the rats were administered with an intragastric probe (DMBA). The following analytical techniques were used to conduct the study: liquid chromatography with mass spectrometry detection, gas chromatography with mass spectrometry detection, immunoenzymatic methods, liquid chromatography with UV detection, and spectrophotometric method.

RESULTS

Based on the study, it was shown that supplementation of animals with genistein in macro, micro and nano forms increased the intensity of the tumor process in rats. Nanogenistein stimulated the initiation of the tumor process, caused stimulation of tumor growth. Macro and micro genistein caused an increase in the intensity of tumor cell proliferation. The effect of supplementation of animals with genistein was an increase in the content of 3-methyladenine, 7-methylguanine, 1-methylguanosine, 1-methyladenosine, 7-methylguanosine, O-methylguanosine, N6-methyl-2'-deoxyguanosine in the urine of rats under tumor process conditions. Supplementation of animals with nano, micro and macrogenistein affects both the content of individual fatty acids and the fatty acid profile in the blood serum of DMBA-treated rats. Animals supplemented with micro- and nanogenistein were characterized by a statistically significantly higher content of pentadecanoic, heptadecanoic, palmitoleic, hexadecenoic, vaccenic acids, as well as linoleic, gamma-linolenic and arachidonic acids, with respect to animals receiving a standard diet only (without supplementation). There was a statistically significantly higher content of both monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (total value) in the blood serum of micro- and nanogenistein-supplemented animals, with respect to animals receiving only a standard diet (without supplementation). There was a statistically significantly lower content of 12-HEPE, HODE and 12-HETE in the blood serum of genistein-supplemented rats, with respect to the content of the aforementioned markers in the blood serum of rats receiving only a standard diet, devoid of supplementation.

CONCLUSIONS

Based on the study, it was shown that supplementation of animals with nano, micro and macro genistein had an effect on both the development of the tumor process, as well as on the concentrations of selected markers in the biological fluids of rats treated with 7,12-dimethylbenzanthracene. Learning about the mechanisms of action of genistein based on the analysis of selected biomarkers seems to be of great importance in assessing the safety of its use. There is a need for further research in this direction.