

Warszawa, 22.12.2022 r.

Dr hab. n. farm. Hanna Mojska
Zakład Żywienia i Wartości Odżywczej Żywności
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Katedra Dietetyki i Badań Żywności
Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy
im. Jana Długosza w Częstochowie
ul. Waszyngtona 4/8, 42-200 Częstochowa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:

„Wpływ nanogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów” wykonanej przez mgr farm. Karolinę Banyś w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem Pani dr hab. Barbary Bobrowskiej - Korczak

Podstawą przygotowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych WUM Pana Prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz - Jaweckiego z dnia 26.10.2022 r.

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego:

Nowotwory złośliwe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie a zachorowalność na nowotwory stale wzrasta. Z szacunkowych danych wynika, że w 2020 r. 2,7 milionów mieszkańców Unii Europejskiej miało zdiagnozowane nowotwory różnych organów. Na podstawie tego oszacowania Komisja Europejska ocenia, że co drugi obywatel UE w ciągu swojego życia może zachorować na raka. Wśród kobiet nowotwory piersi są największym problemem onkologicznym w krajach rozwiniętych. W Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad liczba zachorowań na raka piersi wzrosła ponad dwukrotnie i obecnie jest podstawową przyczyną zgonów z powodu nowotworów wśród kobiet. Wśród czynników ryzyka rozwoju raka sutka wymienia się czynniki wrodzone (wiek, płeć, rasa, predyspozycje genetyczne), które nie podlegają modyfikacji i czynniki zewnętrzne związane m.in. ze stylem życia, wśród których ważną rolę odgrywa sposób żywienia. Czynniki żywieniowe mogą wywierać wpływ zarówno zwiększający, jak i zmniejszający ryzyko rozwoju chorób

nowotworowych. Jest to związane z obecnością w żywności związków chemicznych o określonych kierunkach działania. Do żywieniowych czynników pronowotworowych w przypadku raka sutka zalicza się spożycie alkoholu i dietę bogatotłuszczową, ze szczególnym wskazaniem roli wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-6. Z kolei wśród czynników przeciwnowotworowych wymienia się m.in. kwasy tłuszczowe z rodziny n-3, skoniugowane dieny kwasu linolowego (CLA), witaminy D i E, wapń, naturalne związki występujące w roślinach takie, jak kwercetyna, resweratrol i izoflawony sojowe o działaniu estrogennym. W przypadku tych ostatnich, przede wszystkim genisteiny, wyniki badań są niejednoznaczne i wskazują zarówno na działanie przeciwnowotworowe, jak i pronowotworowe, szczególnie w przypadku nowotworów hormonozależnych. Głównym źródłem izoflawonów, w tym genisteiny w diecie jest soja i jej przetworowy. Soja jest jednym z podstawowych źródeł białka w diecie wegańskiej, zyskującej coraz większą popularność na świecie. W Polsce ocenia się, że dietę wegetariańską/ wegańską stosuje już około 8% społeczeństwa, jeszcze do niedawna był to 1% i jest ona szczególnie popularna wśród młodzieży i młodych dorosłych, przede wszystkim kobiet. Należy również podkreślić, że genisteina występuje w postaci suplementów diety. Powszechna dostępność suplementów diety, skłania do postawienia pytania o bezpieczeństwo ich stosowania, również w kontekście coraz powszechniejszego wykorzystania nanozwiązków. Dlatego podjęcie przez Panią mgr farm. Karolinę Banyś problematyki, w której w oparciu o model zwierzęcy (zgoda nr 645/2018 Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym) oceniany jest wpływ nanogenisteiny na ryzyko rozwoju raka w procesie chemicznie indukowanej kancerogenezy, uważam za aktualne i uzasadnione, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem obszernym, liczy bowiem 160 stron tekstu. Składa się z 8 ponumerowanych rozdziałów obejmujących część teoretyczną ze wstępem i przeglądem piśmiennictwa w realizowanym temacie badawczym, cel pracy, część doświadczalną, wyniki, dyskusję i wnioski oraz piśmiennictwo i streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozdziały I, III, IV i VIII podzielone są dodatkowo na podrozdziały. Część teoretyczna pracy (rozdział I), licząca łącznie 40 stron, stanowi przegląd literatury prezentujący wielokierunkowo charakterystykę problemu. Słowa uznania należą się za rybciny w tej części pracy. Cel badań wraz z uzasadnieniem i pięcioma тезami szczegółowymi zajmuje ponad 1 stronę tekstu. Rozdział zatytułowany „Część doświadczalna” opisujący eksperyment badawczy, materiał biologiczny i zastosowane metody badawcze liczy 12 stron. Rozdziały „Wyniki” i „Dyskusja” stanowią, co zrozumiale przy tak szeroko nakreślonym eksperymencie badawczym, najobszerniejszą część pracy (65 stron). W opinii recenzenta dobrze byłoby, aby podrozdziały w rozdziale „Wyniki” miały bardziej zróżnicowane podtytuły (powtarza się pierwszy człon tytułu). Na zakończenie sformułowano 6 wniosków (Rozdział VI). Układ pracy jest typowy dla opracowania o charakterze doświadczalnym, zachowane są właściwe proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Praca jest napisana językiem komunikatywnym, z użyciem odpowiedniej terminologii naukowej, zabrakło jednak bardzo przydatnego, w tym przypadku, wykazu stosowanych skrótów. Kluczowe problemy badawcze

realizowane przez Doktorantkę zostały wyraźnie i jasno sformułowane a następnie szczegółowo przedyskutowane, co należy podkreślić ze względu na analizę wielu parametrów badawczych. Praca zawiera łącznie 27 tabel i 48 rycin, w tym dwie będące schematami badań (ryc. 16 i 17). Tabele od 9 a ryciny od 18 są związane bezpośrednio z wynikami badań. Tabele prezentujące uzyskane wyniki badań dla grupy kontrolnej i trzech grup badawczych oraz różnych okresów eksperymentu badawczego (4 okresy) i badanych parametrów zostały uzupełnione rycinami, co jest przydatne i ułatwia ocenę uzyskanych wyników. Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z redakcją poszczególnych części pracy, które układają się w logiczną całość.

Jak wspomniano praca jest napisana językiem komunikatywnym, jednak z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że Autorką nie ustrzegła się błędów językowych i literowych, które zostaną wskazane w końcowej części recenzji.

Bibliografia i znajomość omawianej przez Doktorantkę problematyki

Piśmiennictwo obejmuje łącznie imponującą liczbę 336 pozycji, starannie wybranych z obszernego piśmiennictwa dotyczącego zakresu tematycznego omawianej pracy. Ponad 80% (272 pozycje) cytowanych prac stanowią źródła obcojęzyczne. Należy podkreślić, że ponad 50% stanowią publikacje, które ukazały się w ciągu ostatnich 10 lat, co wskazuje na aktualność podjętej tematyki badawczej a także na zapewnienie przez Doktorantkę prezentacji podjętego tematu badawczego w oparciu o najnowsze wyniki innych badaczy. W dysertacji cytowane są ponadto dane z aktualnych (lata 2020 - 2022) baz danych m.in. Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), Krajowego Rejestru Nowotworów i Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC). Zwracam jednak uwagę, że w treści rozprawy nie znalazłam pozycji 105, 218 i 295, które są umieszczone w wykazie piśmiennictwa.

Autorka, na podstawie przeglądu piśmiennictwa, w sposób jasny i przekonujący wyjaśniła istotę, wagę i aktualność podjętego w rozprawie doktorskiej zagadnienia badawczego. Cytowane prace zostały prawidłowo wykorzystane przez Doktorantkę do przedstawienia problematyki badawczej w rozdziale I pt. „Część teoretyczna” oraz do przedyskutowania uzyskanych wyników badań. We Wstępie stanowiącym pierwszy podrozdział części teoretycznej dysertacji Autorka w sposób klarowny uzasadniła potrzebę podjętych badań. W kolejnych podrozdziałach został przedstawiony przegląd piśmiennictwa w kilku wzajemnie uzupełniających się rozległych obszarach tematycznych obejmujących epidemiologię raka piersi i czynniki ryzyka, charakterystykę nowotworów gruczołu piersiowego z podziałem na podtypy, stosowaną aktualnie chemioterapię wraz z omówieniem skutków ubocznych stosowanych leków oraz możliwości wykorzystania różnych rodzajów nanozwiązków w leczeniu raka, przegląd związków pochodzenia roślinnego i ich potencjalnego wykorzystania w terapii nowotworów, omówienie budowy, występowania i działania genisteiny jako czynnika o udokumentowanym działaniu przeciwnowotworowym, ale również pronowotworowym. Ostatni podrozdział „Części teoretycznej” został poświęcony biomarkerom, zarówno tym wykorzystywanym we wczesnym wykrywaniu raka piersi, jak i tym, co do których brak jeszcze dostatecznie udokumentowanych wyników badań. Należy podkreślić, że każdy

z podrozdziałów części teoretycznej pracy zawiera aktualną i specjalistyczną wiedzę i po pewnych uzupełnieniach i działaniach redakcyjnych mógłby stanowić odrębną publikację przeglądową lub całość tego rozdziału – monografię tematu. Do tej części mam pytanie dotyczące powoływania się przez Doktorantkę, w kwestii leków dopuszczonych do stosowania w terapii raka piersi, na FDA (Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków) a nie na odpowiednie listy leków dopuszczonych do stosowania w Unii Europejskiej i w Polsce. Jak jest tego uzasadnienie?

Podsumowując, przedstawione w Rozdziale I treści potwierdzają rozległą wiedzę Doktorantki na temat prezentowanych zagadnień naukowych. Świadczą również o bardzo dużym nakładzie pracy włożonym w przygotowanie tej części dysertacji.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej:

Problem ogólny, sformułowany w celu pracy, zakładał przeprowadzenie na modelu zwierzęcym oceny działania genisteiny podawanej w trzech formach wynikających z wielkości cząstek (nano, mikro i makro) na rozwój i przebieg indukowanego chemicznie procesu kancerogenezy. Doktorantka postawiła pięć tez badawczych, które precyzowały cele badawcze w warstwie szczegółowej i obejmowały m.in.: ocenę wpływu suplementacji genisteiną zwierząt doświadczalnych na chemicznie indukowany proces nowotworowy wraz z oceną roli procesów epigenetycznych; ocenę wpływu genisteiny na zawartość i metabolizm kwasów tłuszczowych w rozwoju i przebiegu procesu nowotworowego indukowanego DMBA u zwierząt doświadczalnych; ocenę roli stanu zapalnego, poprzez ocenę markerów, w rozwoju procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów suplementowanych genisteiną. Cel główny i postawione tezy szczegółowo zakresliły plan i zakres badań.

W dalszej części rozprawy Autorka szczegółowo przedstawiła opis eksperymentu badawczego, procedury wytwarzania nano i mikrogenisteiny, materiał biologiczny pozyskany od zwierząt doświadczalnych, który stanowiły: mocz, surowica krwi, narządy (wątroba i śledziona) i guzy nowotworowe, które rozwinęły się w trakcie eksperymentu oraz zastosowane metody badawcze, w tym analityczne. Eksperyment zakładał podział zwierząt na 4 grupy: kontrolną i trzy grupy suplementowane genisteiną odpowiednio w formie makro, mikro i nano przez okres od 6 tyg. do 20 tyg. życia (dekapitacja). W tym czasie dwukrotnie podawano zwierzętom czynnik rakotwórczy (DMBA) sondą do żołądka. W celu realizacji założeń pracy oceniano czas pojawienia się guzów i ich częstotliwość u osobnika i w grupie a po dekapitacji zwierząt, masę guzów. Dokonano oceny histopatologicznej (stopień złośliwości) oraz intensywności proliferacji na podstawie średniej liczby mitoz w obszarze pola widzenia. W trakcie eksperymentu w konkretnych interwałach czasowych w moczu zwierząt oznaczano zawartość metylopo pochodnych nukleozydów a w surowicy krwi zawartość kwasów tłuszczowych oraz markerów stanu zapalnego 12-HEPE, HODE, 15-HETE, 12-HETE i 5-HETE, interleukiny 1 i interleukiny 6 a także zawartość metaloproteiny 9. Na podstawie zawartości kwasów tłuszczowych w surowicy krwi oszacowano aktywność Δ -5 i Δ -6 desaturaz oraz wskaźniki aterogenności (AI) i trombogenności (TI) oraz stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych (b/H). Wyjaśnienia wymaga

celowość oszacowania ww. wskaźników (AI, TI i h/H) w kontekście oceny wpływu genisteiny na rozwój i przebieg indukowanej chemicznie kancerogenezy.

Do realizacji celu badań Doktorantka wykorzystwała nowoczesne metody analityczne, w tym m.in. wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) i chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrem mas do pomiaru czasu przelotu (prawidłowy skrót, to GC-TOF-MS) oraz metodę immunoenzymatyczną ELISA. Szczególnie dwie pierwsze z ww. metod gwarantują możliwości oznaczenia ilościowego związków na bardzo niskich poziomach detekcji, właściwego ich rozdzielenia, identyfikacji oraz odpowiedniej precyzji i powtarzalności wyników. Wykorzystanie przez Doktorantkę ww. aparatury badawczej jest mocną stroną recenzowanej pracy i wskazuje na dobrą znajomość nowoczesnych technik analitycznych. Wszystkie metody zostały szczegółowo opisane z uwzględnieniem sposobu przygotowania próbek, parametrami konkretnego badania i opisem zastosowanej aparatury badawczej. W opisach metod instrumentalnych zabrakło jednak informacji dotyczących krzywych kalibracyjnych i ich zakresów a także przynajmniej podstawowych parametrów wydajności metod analitycznych. Informacja, że do identyfikacji (oceny jakościowej) poszczególnych analitów wykorzystano roztwory wzorcowe, nie odnosi się do oceny ilościowej, która wyrażana jest w konkretnych jednostkach np. w odniesieniu do nukleozydów w ng/mg kreatyniny (tabela 14 - 21) czy w µg/ml w odniesieniu do kwasów tłuszczowych (tabela 22). Szkoda, że w przypadku ww. metod nie dołączono przykładowych krzywych kalibracyjnych. Uwagi te dotyczą również metody oznaczania metabolitów kwasów tłuszczowych (HPLC-UV). Wyjaśnienia wymaga także podanie wyłącznie jednej pary jonów dla oznaczanych nukleozydów metodą LC-MS/MS. Tandemowa spektrometria mas pozwala na uzyskanie zarówno jonów macierzystych, jak i potomnych, z których pierwsza para służy do identyfikacji a druga do potwierdzenia. Przygotowanie do druku uzyskanych wyników badań będzie wymagało stosownego uzupełnienia o ww. dane. W rozdziale Materiał i metody nie podano również szczegółowych informacji o sposobie oceny masy ciała zwierząt i masy poszczególnych wyizolowanych organów oraz guzów nowotworowych, w tym m.in. informacji o wykorzystanym do tej oceny wyposażeniu pomiarowym. Tymczasem wyniki tej oceny poddano analizie statystycznej i przedstawiono w rozdziale IV:2 a także poddano dyskusji (str. 109).

Analizując przedstawione wyniki przeprowadzonego eksperymentu w odniesieniu do podstawowego celu poznawczego i praktycznego badań należy stwierdzić, że genisteina wpływała na rozwój i przebieg procesu nowotworowego a jej działanie zależało od wielkości cząstek, w jakich była podawana zwierzętom doświadczalnym. Tym samym cel badań został zrealizowany w warstwie ogólnej i potwierdzona została pierwsza sformułowana teza badawcza. W przyjętym modelu badawczym nie uzyskano jednak potwierdzenia przeciwnowotworowych właściwości genisteiny, podawanej w postaci zawiesiny w wodzie, w ilości 0,2 mg/kg m.c. zwierząt doświadczalnych. Przeciwnie podawanie genisteiny w postaci mikro i nano spowodowało wzrost intensywności przebiegu procesu nowotworowego u szczurów. We wszystkich grupach zwierząt, u których chemicznie indukowano kancerogenezę, pojawiły się guzy nowotworowe, niezależnie czy była to grupa kontrolna (bez suplementacji genisteiną) czy grupy, które otrzymywały ten związek w postaci nano, mikro czy makro. Obserwowano natomiast znaczące różnice m.in. w czasie pojawiania się pierwszego

guza i liczbie guzów na osobnika. Co ważne, najwcześniej guzy nowotworowe pojawiły się w grupie zwierząt suplementowanych nanogenisteiną, dwa tygodnie wcześniej niż w grupie niesuplementowanej (kontrola) i 3 tygodnie wcześniej w porównaniu do grup mikro i makro. Średnia masa guzów była największa w grupach suplementowanych mikro i nanogenisteiną, podobnie jak średnia masa narządów: śledziony i wątroby (różnice nieistotne statystycznie), których powiększenie towarzyszy zwykle procesom nowotworowym. Ocena histopatologiczna pobranych od zwierząt doświadczalnych guzów nowotworowych wykazała w grupach suplementowanych mikro i nanogenisteiną, III stopień złośliwości. U zwierząt z grupy kontrolnej i suplementowanych makrogenisteiną były to guzy II stopnia. Stwierdzona średnia liczba mitoz była również najwyższa w guzach pochodzących z grup suplementowanych mikro i nanogenisteiną, co świadczyło o nasilonej proliferacji komórek nowotworowych. Wyniki wskazują jednoznacznie, że wielkość cząstek w jakich podawana jest substancja czynna ma zasadniczy wpływ na jej działanie. W przypadku genisteiny, cząsteczki nano i mikro nasilały proces kancerogenezy. Uzyskane przez Doktorantkę, w tej części badań, wyniki uważam za bardzo ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Wymagają one oczywiście dalszego potwierdzenia, ale wskazują jednoznacznie na fakt podniesiony przez Autorkę w dyskusji, że nanocząsteczki mają nowe właściwości fizyczne w porównaniu do cząstek makro, ale również może nastąpić zmiana m.in. ich właściwości strukturalnych i biologicznych, co w efekcie może nasilać proces kancerogenezy. Jest to niezwykle ważne w kontekście stosowania suplementów zawierających genisteinę. Zwracam ponadto uwagę, że genisteina w formie makro również nie hamowała postępu i nasilenia chemicznie indukowanej kancerogenezy. W grupie suplementowanej makrogenisteiną, w porównaniu do grupy kontrolnej, guzy nowotworowe pojawiały się co prawda tydzień później i ilość guzów na jednego osobnika była mniejsza, ale częstotliwość występowania guzów była taka sama, podobnie jak stopień złośliwości (II). Dodatkowo obserwowano w tej grupie istotnie większą średnią liczbę mitoz w porównaniu do grupy kontrolnej (4,46 vs. 1,79). Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wydają się potwierdzać jeszcze jeden aspekt, szczególnie podnoszony obecnie w odniesieniu do suplementów diety, że związki biologicznie czynne obecne w żywności i spożywane z żywnością a takim związkiem jest genisteina, mogą wykazywać inny kierunek i siłę działania niż ich syntetyczne odpowiedniki obecne w suplementach. Jest to niezwykle ważne w odniesieniu do bezpieczeństwa stosowania suplementów.

Kontekst poznawczy badań został poszerzony o oznaczenie w płynach ustrojowych zawartości uznanych i potencjalnych markerów procesu nowotworowego, w tym metylowych pochodnych nukleozydów, kwasów tłuszczowych i ich wybranych metabolitów oraz cytokin (IL-1 i IL-6) i 9-metyloproteinazy. Poszukiwanie markerów wczesnych zmian związanych z procesem chorobowym, jeszcze przed etapem klinicznej manifestacji choroby/ zaburzenia stanu zdrowia, jest często kluczowe dla podjęcia leczenia i jego skuteczności. Doktorantka podjęła się wykazania, że przy zastosowaniu dostępnych nowoczesnych metod analitycznych można obserwować na poziomie materiału genetycznego zmiany indukowane czynnikami zewnętrznymi (rakotwórczymi). Wskaźnikami zmian profilu epigenetycznego materiału genetycznego wskazującymi na proces nowotworowy może być podwyższona zawartość metylowych pochodnych nukleozydów w moczu, których zawartość, jak wykazano

w literaturze, wzrasta już we wczesnych etapach procesu nowotworowego. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły Autorce na stwierdzenie, że obserwowana była „synergistyczna reakcja DMBA i genisteiny w rozwoju procesu nowotworowego u szczurów”, na co wskazywała istotnie wyższa zawartość nukleozydów w moczu szczurów suplementowanych genisteiną w porównaniu z grupą kontrolną, w okresie trwania eksperymentu. Można się zgodzić z tym stwierdzeniem, chociaż zwracam uwagę, że wyższa niż w grupie kontrolnej zawartość nukleozydów w moczu zwierząt z grup suplementowanych genisteiną, była obserwowana już w 9 tygodniu badania a więc przed podaniem czynnika kancerogennego (DMBA).

Punktem wyjścia do kolejnych badań był dobrze udokumentowany w licznych badaniach udział pokarmowych kwasów tłuszczowych zarówno w etiologii, jak i w profilaktyce szeregu chorób i zaburzeń stanu zdrowia oraz obserwowane zmiany w metabolizmie kwasów tłuszczowych w wyniku procesu nowotworowego. Uzyskane wyniki w odniesieniu do kwasów tłuszczowych nie były jednoznaczne i słowa uznania należą się Doktorantce za ich pogłębioną analizę i przedyskutowanie w oparciu o aktualne dane literaturowe. Obserwowane istotnie wyższe zawartości PUFA w surowicy krwi zwierząt suplementowanych nano i mikrogenisteiną wydają się wskazywać na nasilenie, w siateczce endoplazmatycznej komórek, procesu przemian kwasów tłuszczowych od prekursorów kwasów linolowego (LA, 18:2 n-6) i α -linolenowego (ALA, 18:3 n-3) do ich długołańcuchowych metabolitów, odpowiednio kwasu arachidonowego (ARA, 20:4 n-6) i dokozaheksaenowego (DHA, 22:6 n-3), w wyniku suplementacji badanego związku w formie mikro i nano. Zwraca uwagę również obserwowana ponad pięciokrotnie wyższa zawartość ARA, prekursora prozapalnych eikozanoidów (prostaglandyn serii 2, tromboksanów serii 2 i leukotrienów serii 4), w stosunku do DHA. W pewnym stopniu potwierdzeniem tych obserwacji była oszacowana przez Doktorantkę wyższa, chociaż nieistotna statystycznie, aktywność Δ -5 desaturazy, kluczowego enzymu w ww. przemianach, w grupie suplementowanej nanogenisteiną. Stan zapalny jest obserwowany w rozwoju procesu nowotworowego. Zmiana wzajemnego stosunku kwasów z rodzin n-6 i n-3 a w szczególności wyższa zawartość w diecie DHA, którego metabolity tkankowe wykazują silne właściwości przeciwzapalne, może być czynnikiem wspomagającym terapię. W mojej ocenie bardzo interesujące są również wyniki wskazujące na istotnie większą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchu tzn. kwasów pentadekanowego (C15:0) i heptadekanowego (C17:0), w grupach zwierząt suplementowanych genisteiną, przede wszystkim mikro i nano. Obecność tych kwasów w surowicy krwi jest związana m.in. z mniejszą częstością występowania niedokrwiennej choroby serca i cukrzycy typu 2. Obydwa kwasy stymulują rozwój prawidłowej mikroflory jelitowej a ich zawartość w surowicy krwi jest wskazywana, jako marker diety bogatobłonnikowej. Dane literaturowe wskazują również na ich właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych. Jednak w warunkach niniejszego eksperymentu trudno te wyniki zinterpretować. Jest to interesujący kierunek badań, który warto kontynuować. W tym miejscu zwracam uwagę, że Autorka cytując w dyskusji pracę przeglądową (poz. 297) a nie-oryginalną napisała, że „zwiększona podaż SFA wraz z dietą wiązała się z obniżonym ryzykiem zachorowania na nowotwory”. Jest to zbyt daleko idące uogólnienie. W grupie nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) występują kwasy krótkołańcuchowe (4:0 do 8:0) o udokumentowanym w badaniach działaniu

przeciwnowotworowym m.in. wykazują działanie antyproliferacyjne i indukują apoptozę komórek nowotworowych. Obecne są również kwasy średniołańcuchowe (12:0 i 14:0), których nadmierne spożycie z diety jest związane ze wzrostem ryzyka zapadalności na nowotwory oraz kwasy długołańcuchowe (16:0 i 18:0) o niejednoznacznej roli w etiologii chorób nowotworowych.

W warunkach eksperymentu, w procesie chemicznie indukowanej kancerogenezy, Doktorantka oceniła ponadto wpływ genisteiny w postaci makro, mikro i nano na wybrane markery stanu zapalnego: pochodne kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETE), hydroksyeikozapentaenowych (HEPE), interleukinę 1 (IL-1) i interleukinę 6 (IL-6). Istotnie mniejszą zawartość w grupie zwierząt suplementowanych genisteiną stwierdziła wyłącznie w odniesieniu 12-HEPE; HODE oraz 12-HETE. Zawartość IL-1 i IL-6 w surowicy krwi szczurów traktowanych DMBA nie różniła się istotnie pomiędzy grupami suplementowanymi genisteiną i grupą kontrolną. Autorka zaobserwowała również wyższą zawartość metaloproteinazy 9 - MMP-9 w surowicy krwi zwierząt suplementowanych w porównaniu do zwierząt pozbawionych suplementacji, jednak różnica nie była statystycznie znamienna. Z poznawczego i praktycznego punktu widzenia należy stwierdzić, że istotnym aspektem przeprowadzonych badań było wykazanie przez Doktorantkę, że genisteina w postaci wyizolowanego związku nie hamuje a wręcz może nasilać proces nowotworowy a także wykazanie, że intensywność tego działania zależy od wielkości cząstek w jakich jest podawana.

Podsumowując pragnę podkreślić, że przeprowadzone wnikliwie analizy umożliwiły Doktorantce uzyskanie wiarygodnych wyników badań, które stały się podstawą do przeprowadzenia dyskusji i formułowania wniosków. W pracy zabrakło jednak wspólnego mianownika dla wszystkich przeprowadzonych analiz w postaci syntetycznego podsumowania całości badań, w tym potwierdzenia lub odrzucenia postawionych tez badawczych. Jednocześnie można uznać, że takie podsumowanie stanowi sześć obszernych wniosków przedstawionych w części końcowej pracy. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że pomimo dużej ilości wyników Autorka niezwykle biele poradziła sobie z ich interpretacją i dyskusją, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, dużej wiedzy oraz wnikliwej analizie bibliografii związanej z tematyką badawczą. Warto zaznaczyć, że pomimo bardzo szeroko zakrojonych badań Autorka uniknęła chaosu i powiązała wyniki w logiczną całość. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy badawczej.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej wybrane uwagi do całości tekstu rozprawy:

- str. 6 – wiersz 2: zamiast „z przedstawionego” powinno być „z przedmiotowego”
- str. 7 – wiersz 12: skrót WHO był już wcześniej użyty w tekście – nie ma potrzeby używania w jednym zdaniu dwóch określeń tej samej Organizacji
- str. 8 – wiersz 11: usunięcie „z”
- str. 8 – wiersz 12: zamiast „spożywaniem (...) występowaniem” powinno być „spożywanie (...) występowanie”
- str. 12 – wiersz 10 – FDA należy przywołać również polską nazwę

- str. 12 – wiersz 12: „W leczeniu nowotworów piersi najczęściej wykorzystuje się następujące grupy leków: hormonoterapię...”, hormonoterapia nie jest lekiem a leczeniem
 - str. 14 – akapit 3 - wiersz 9: „Najczęstszymi występującymi działaniami...” powinno być „Najczęściej występującymi...”
 - str. 15 – akapit 2 – wiersz 4: „...obecne stosowane terapie...” powinno być „obecnie stosowane...”
 - str. 15 wiersz 15 „wynalezienia” (lit.)
 - str. 15 wiersz 23 „przeciwnotworowej” (lit.)
 - str. 16 – rozdział 5 – wiersz 3: „Precyzyjne dostarczanie substancji aktywnej terapeutycznej...” – powinno być „...substancji aktywnej terapeutycznie...”
 - str. 18 wiersz 11 „leczonych na przerzutowego raka piersi” – „z powodu”
 - str. 23 tabela 4 – „komłorek” (lit.)
 - str. 33 akapit 1 wiersz 3 – „produktów” (lit.)
 - str. 39 „przeprowadzonyc” i „nowotwór” (lit.)
 - str. 39 niezbyt zręczne sformułowanie: „raków piersi” lepiej by brzmiało przypadków raka piersi lub nowotworów
 - str. 41 „...dotyczące wpływy...” (lit.)
 - str. 44 „naekspresja” (lit.)
 - str. 44 „Z powodu braku niewystarczająco skutecznej terapii...” – powinno być „...braku wystarczająco skutecznej...”
 - str. 108 jest dwukrotnie „min” powinno być „m.in.”;
 - str. 108 „soji” (lit.)
 - str. 109 jest „trzy krotnie” powinno być „trzykrotnie”
 - str. 116 kwas c16:1 n-7, to kwas palmitooleinowy a nie kwas palmitynowy
 - str. 117 „Odpowiednia podaż PUFA jest niezbędna do budowy błon komórkowych o odpowiednim składzie, ale również wielonienasycone kwasy tłuszczowe są prekursorami mediatorów stanu zapalnego.” – należy dodać z rodziny n-6
 - str. 119 wiersz 23: powinno być lipooksygenazy
 - str. 119 wiersz 32: zamiast „w odniesieniu” powinno być „w porównaniu”
- W całym tekście spójniki i przymyki powinny być przenoszone do następnej linii.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawione powyżej oraz wcześniej zawarte w tekście recenzji uwagi mają w większości charakter redakcyjny i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji.

wartości merytorycznej dysertacji.

Wniosek o wyróżnienie:

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej Pan mgr farm. Karoliny Banyś pt: *„Wpływ nanogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów”* wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie recenzowanej pracy. Wniosek o wyróżnienie motywuję wagą podjętego tematu, czyli badaniami nad wpływem genisteiny w trzech formach makro, mikro i nano na ryzyko rozwoju guzów nowotworowych u zwierząt doświadczalnych,

w warunkach chemicznie indukowanej kancerogenezy. Genisteinie przypisywane są właściwości przeciwnowotworowe i jest powszechnie dostępna w postaci suplementów. Badania Doktorantki wykazały bezspornie, że może indukować i nasilać proces kancerogenezy w warunkach eksperymentu a siła oddziaływania zależy od wielkości cząstek w jakiej jest podawana. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w nowatorski sposób zaplanowała i konsekwentnie przeprowadziła bardzo szeroki zakres badań z wykorzystaniem wielu metod analitycznych, dzięki czemu wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników są dobrze udokumentowane. Za wyróżnieniem, w mojej opinii, przemawia również fakt, że praca ma zarówno walor poznawczy, jak i aplikacyjny.

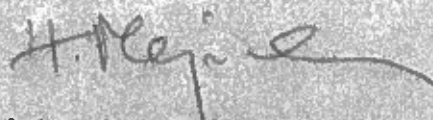
Wniosek końcowy:

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Karoliny Banyś pt: "Wpływ nanogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów" uważam, że praca ta stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe a przedstawione w recenzji uwagi i sugestie nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej dysertacji.

Przedłożona rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Banyś pt. „Wpływ nanogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów” w pełni spełnia wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim w świetle art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz warunków określonych w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

W związku z powyższym, proszę Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr farm. Karoliny Banyś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Dr hab. n. farm. Hanna Mojska