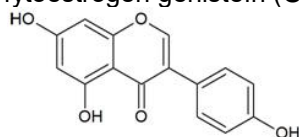


APVV-16-0207: Genistein a estrogénová signalizácia: sľubná molekula zlepšujúca hojenie rán u postmenopauzálnych žien? (Genistein and estrogen signaling: promising molecule improving tissue repair in post-menopausal women?)

Genisteín patrí medzi prírodné selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM). SERM sú schopné dosiahnuť prospešný efekt estrogénov a zároveň minimalizovať škodlivé/nežiaduce účinky estrogénov na ostatné orgány/tkanivá. Klinicky najznámejším predstaviteľom prírodných SERM-vo je fytoestrogén genisteín (Obr. 1).



Obr. 1 Chemická štruktúra genisteínu.

a) Genisteín a endotelová bunka - *in vitro*

Pre objasnenie možného mechanizmu účinku genisteínu na endotelové bunky (HUVEC) sme sledovali expresný profil vybraných génov zapojených do angiogenézy v prítomnosti (Tabuľka 1) a neprítomnosti VEGF (Tabuľka 2). Z 84 analyzovaných génov, 9 génov ukázalo významnú up-reguláciu u HUVEC inkubovaných s genisteínom (100 nM) v prítomnosti VEGF a žiaden zo sledovaných génov nebol down-regulovaný. Avšak bez prítomnosti VEGF sme pozorovali len dva down-regulované a žiaden up-regulovaný gén.

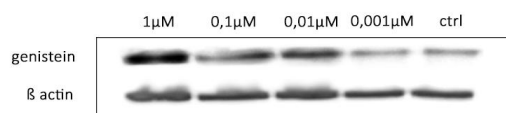
Tabuľka 1. Zmena expresie (fold change) génov u HUVEC vystavených genisteínu (100 nM) v prítomnosti VEGF (25 ng/ml) v porovnaní s čistým VEGF.

Symbol génu	Názov génu	Genisteín+VEGF vs. VEGF
COL18A1	Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain	2.2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	2.4
CXCL5	C-X-C Motif Chemokine Ligand 5	2.8
IL-6	Interleukin 6	2.1
ITGB3	Integrin Subunit Beta 3	2.6
MMP-14	Matrix Metalloproteinase 14	2.4
TIMP-2	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2	2.2
TIMP-3	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3	2.2
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A	2.4

Tabuľka 2. Zmena génovej expresie u HUVEC po pridaní genisteínu (100 nM) v porovnaní s kontrolou.

Symbol génu	Názov génu	Genisteín vs. kontrola
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	-2.7
SERPINF1	Serpin Family F Member 1	-2.1

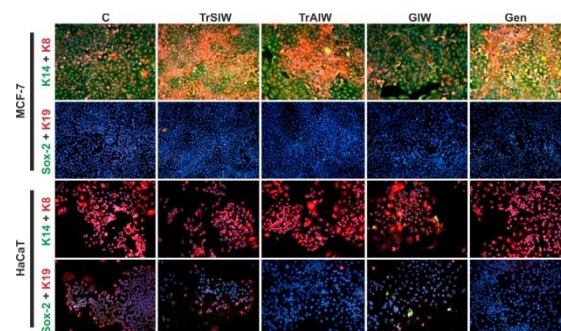
Estrogény vykazujú protektívny účinok na ischémiu kože aj cestou up-regulácie anti-apoptického proteínu Bcl-2 (Toutain et al. Circ Res. 2009;104(2):245-54). V našej práci sme ukázali, že genisteín tiež up-reguluje Bcl-2 (Obr. 2) čo môže viesť k podobnému efektu na modeli kožného laloka (viď bod c).



Obr. 2 Western-blot analýza expresie Bcl-2 v endotelových bunkách po pridaní genisteínu.

b) Genisteín a epitelová bunka - *in vitro*

Cieľom našich ďalších experimentov bolo zistiť ako vybrané rastlinné extrakty obsahujúce fytoestrogény a genisteín regulujú diferenciáciu normálnych keratinocytov (HaCaT) a nádorových buniek (estrogén pozitívny karcinóm prsníka, MCF-7). Ukázali sme, že genisteín a extrakt ďateliny (*Trifolium pratense* L.) indukujú expresiu keratínu-8 (luminálny a prognostický znak pri karcinóme prsníka) len u MCF-7 buniek (Obr. 3). Tento efekt sme nepozorovali u extraktu sóje (*Glycine max* L. Merr.) a ani u línie keratinocytov HaCaT (Obr. 3). Z tohto pohľadu bude ešte potrebné uskutočniť ďalší výskum či je bezpečné konzumovať sóju u pacientov s estrogén pozitívnym karcinómom prsníka.



Obr. 3 Expresný profil keratinocytov HaCaT a nádorových buniek MCF-7 po stimulácii s vybranými extraktmi obsahujúcimi fytoestrogény a genisteínom.

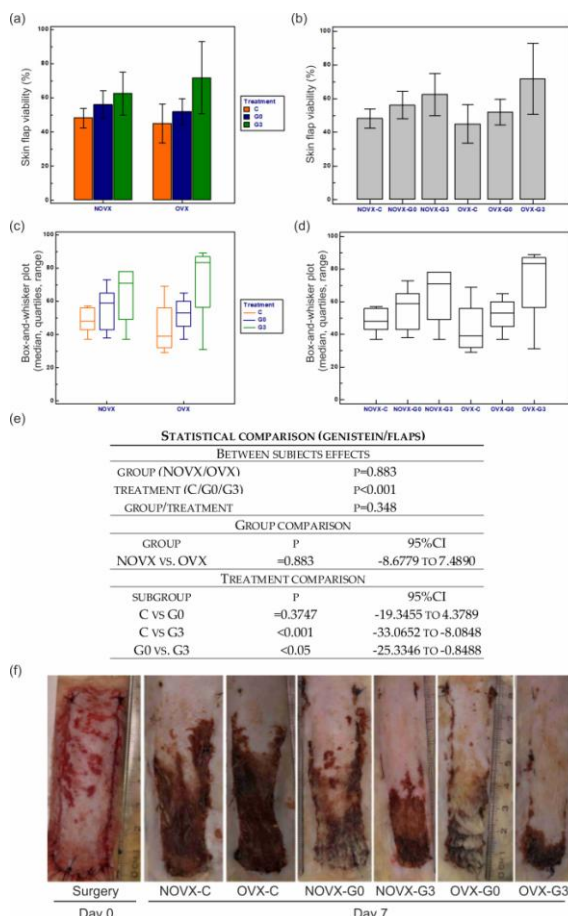
c) Genisteín a prežívanie kožného laloka - *in vivo*

Tri mesiace po ovarektómii bol na potkanoch realizovaný experiment s prežívaním kožného laloka po liečbe s genisteínom (Obr. 4).



Obr. 4 Rozmery a rozdelenie (do 4 častí, F1-F4, pre potreby histológie) kožného laloka (flap) na chrbte potkana.

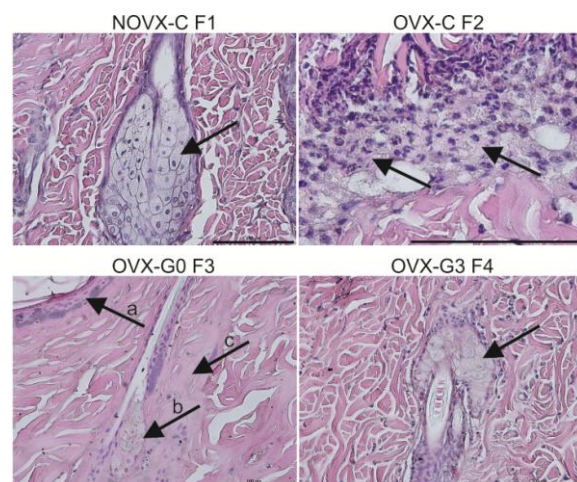
Makroskopická analýza kožných lalokov ukázala, že systémová liečba genisteínom je schopná významne zvýšiť prežívanie kožných lalokov u samic potkanov. Najvyššia miera viability bola pozorovaná v skupine zvierat OVX-G3 (začiatok liečby s genisteínom 3 dni pred vytvorením laloka u ovariectomizovaných zvierat), zatiaľ čo najnižšia v skupine OVX-C (neliečená ovariectomizovaná kontrola) (Obr. 4b). Napriek tomu, že obojstranná analýza rozptylu neodhalila signifikantné rozdiely medzi kontrolnou a ovariectomizovanou (Obr. 4a) skupinou zvierat, porovnanie samotnej liečby jasne naznačuje, že protektívny účinok genisteínu na ischemiu kože je účinný len vtedy, ak liečba začína tri dni pred chirurgickým zákrokom a nie až v deň vytvorenia laloka (Obr. 4e).



Obr. 4 Analýza makroskopického hodnotenia prežívania kožných lalokov u ovariectomizovaných potkanov po liečbe s genisteínom.

Histologická analýza bola vykonaná za účelom porovnania makroskopicky pozorovaných ischemických lézií so štruktúrou kože. Ovariectómia zvýšila hustotu aj veľkosť mazových žliaz a hrúbku kože ako aj výskyt tukového tkaniva. Proximálna časť (F1) všetkých lalokov nevykazovala žiadne známky ischemie (Obr. 5 F1). Dve stredné časti lalokov (F2 a F3) vykazovali rozdielny stupeň

poškodenia. Tu boli nájdené rozdielne lokalizované oblasti bohaté na neutrofilny tvoriace demarkačný lem. Zatiaľ čo u neliečených skupín boli vidieť demarkačné línie v druhej časti lalokov (Obr. 5 F2), liečba genisteínom zvýšila viabilitu a posunula demarkačný lem do tretej časti (F3) laloka. Demarkačné línie u zvierat, u ktorých sa liečba začala 3 dni pred operáciou, boli umiestnené dokonca až medzi treťou a štvrtou časťou (F3 / F4) lalokov. Degenerácia tkaniva smerom k nekróze bola prominentná v mediálnych častiach (F3), hlavne vo vlasových folikuloch, mazových žľazách a v samotnej epidermis, čo naznačuje prítomnosť tzv. "ghost cells" (Obr. 5 F3: detail na epidermis [a], vlasový folikul / mazová žľaza [b] a kolagénová štruktúra [c]). Podobný obraz bol pozorovaný aj v distálnych častiach kožných lalokov z potkanov liečených genisteínom (Obr. 5 F4). Avšak distálne časti (F4) lalokov boli u všetkých skupín úplne poškodené so stratou integrity tkaniva vo všetkých vrstvách kože.



Obr. 5 Histologický pohľad na vybrané štruktúry kože z experimentu s kožnými lalokmi.

d) Klinický význam

V súčasnosti je genisteín v klinickom testovaní a testy naznačujú, že jeho systémové užívanie je efektívne a bezpečné pri prevencii a liečbe vybraných onkologických ochorení (Khan et al. Cancer Prev Res 2012; 5():309-19; Lohr et al. Pancreatology 2016; 16(): 640-5). Z tohto pohľadu môžeme predpokladať, že jeho testovanie ako molekuly zrýchľujúcej hojenie rán u post-menopauzálnych žien by mohlo byť tiež bezpečné a efektívne. Pokiaľ by sa nám podarilo nájsť vhodný nosič pre jeho lokálnu aplikáciu (bez nutnosti systémovej liečby vo forme napr. aktívneho krytia rán), zásadným spôsobom by sme tak zvýšili a zjednodušili jeho klinickú aplikovateľnosť.