

**Molekularny mechanizm działania genisteiny w aspekcie  
jej potencjalnego zastosowania w leczeniu łuszczycy  
mgr Elwira Smolińska**

Łuszczyca należy do najczęstszych przewlekłych chorób zapalnych skóry. Występuje w populacji z różną częstością od 1 do 3% w krajach europejskich oraz Stanach Zjednoczonych. Klinicznie manifestuje się wykwitami grudkowymi z towarzyszącym złuszczeniem. Istnieje duża różnorodność obrazu morfologicznego i nasilenia zmian, od nielicznych ognisk, ograniczonych do szczególnych okolic, do ciężkich postaci, zajmujących całą skórę i stawy, a nawet prowadzących do inwalidztwa.

Zmiany skórne są wynikiem nadmiernej liczby podziałów komórkowych w warstwie podstawnej naskórka oraz przyspieszonego, nieprawidłowego cyklu dojrzewania keratynocytów, któremu towarzyszy nasilony naciek zapalny w obrębie skóry, złożony głównie z limfocytów, monocytów oraz granulocytów, aktywnie penetrujących do naskórka przez rozszerzone pory naczyń włosowatych. Pomimo zidentyfikowania wielu potencjalnych genów predysponujących do zachorowania na łuszczycę, czynniki genetyczne wydają się niewystarczające do rozwoju zmian łuszczycowych. W patogenezie podkreśla się także udział zjawisk immunologicznych. Uważa się, że nadmierna proliferacja naskórka w łuszczycy jest następstwem zaburzeń immunologicznych związanych z aktywnością limfocytów T pomocniczych (Th) oraz wydzielanych przez nie cytokin, przede wszystkim czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oraz interleukin (IL): IL-6, IL-8, IL-17, IL-19, IL-23. Aktywacja limfocytów Th1 oraz produkcja cytokin doprowadza do nadmiernej proliferacji komórek naskórka oraz indukuje i podtrzymuje stan zapalny. Również limfocyty Th17, które powstają przy udziale komórek dendrytycznych oraz makrofagów, produkują cytokiny prozapalne, między innymi IL-17 oraz TNF- $\alpha$  [1].

W łuszczycy istotną rolę odgrywają również czynniki wewnątrz- i zewnątrzustrojowe, które mogą zapoczątkować lub nasilać proces chorobowy oraz prowokować wystąpienie kolejnych nawrotów choroby. Do najczęściej spotykanych czynników wyzwalających należą między innymi: przewlekłe infekcje bakteryjne i grzybicze, stres, urazy mechaniczne, zmiany stężeń hormonów występujących głównie w okresie menopauzy, alkohol, niektóre leki, czy promieniowanie UV.

W zależności od wieku wystąpienia u pacjenta pierwszych objawów choroby wyróżnia się dwa typy łuszczycy: wczesny i późny. Za wczesny początek łuszczycy uznawane są zmiany pojawiające się zwykle u chorych pomiędzy 15 a 40 rokiem życia. W tym przypadku choroba ma nieregularny przebieg z tendencją do zajmowania przez proces zapalny dużej powierzchni skóry, obserwuje się też rodzinne występowanie schorzenia oraz

często obecność wybranych antygenów zgodności tkankowej HLA (ang. *human leukocyte antigens*). Uważa się, iż antygen HLA-Cw6 jest charakterystyczny dla łuszczycy o ciężkim przebiegu występującej u ludzi młodych. Z kolei drugi typ łuszczycy, późny, o przebiegu bardziej łagodnym, występuje najczęściej w przedziale 50 a 70 lat. Wykwity skórne mają charakter ograniczony do określonych okolic ciała. W tym typie łuszczycy nie wykazano natomiast silnych i ewidentnych związków z czynnikami genetycznymi.

Łuszczyca wpływa bardzo negatywnie na jakość życia pacjentów, zaburza codzienne funkcjonowanie i stosunki międzyludzkie u ponad 80% chorych. Ocenia się, że u około 5 – 30% pacjentów z łuszczyką dochodzi do zajęcia procesem chorobowym również stawów. Dodatkowo, dermatоза ta współistnieje z innymi schorzeniami układowymi, takimi jak cukrzyca, nadciśnienie, choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelit, zespół metaboliczny, choroba sercowo-naczyniowa, udar mózgu lub zaburzenia rytmu serca. Łuszczyca jest nadal chorobą nieuleczalną, nie jest możliwe całkowite i trwałe jej wyleczenie, a nawroty choroby są regułą, leczenie jest więc wyłącznie empiryczne. Dostępna jest cała gama leków stosowanych miejscowo i ogólnie, w celu usunięcia łusek, spowolnienia tempa przemiany keratynocytów, poprawienia różnicowania komórek, zahamowania zapalenia, a także leków wpływających na kompleksowe reakcje immunologiczne. Należy wybrać taką metodę leczniczą, aby z jednej strony umożliwiła kontrolowanie przebiegu choroby, maksymalnie ograniczając jej negatywny wpływ na życie pacjenta, a z drugiej strony, aby skutki uboczne długotrwałego leczenia były jak najmniejsze.

Wyniki opublikowanych badań wskazują, że podejmowane są próby wykorzystania w leczeniu łuszczycy substancji pochodzenia naturalnego. W literaturze liczne są doniesienia na temat flawonoidów oraz ich właściwości immunomodulacyjnych i antyproliferacyjnych. Wśród flawonoidów, związków organicznych stanowiących wtórne metabolity roślin, izoflawon genisteina (5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopirany-4-on) jest przykładem substancji o potencjalnym zastosowaniu w terapii łuszczycy. Jednocześnie, liczne badania wykazały, że genisteina posiada plejotropowy mechanizm działania, wykazuje właściwości immunosupresyjne, inicjacji apoptozy i hamowania angiogenezy w komórkach nowotworowych, wpływa także na regulację metabolizmu. Oprócz tego, działa przeciwutleniająco, hipotensyjnie, spazmolitycznie, przeciwzapalnie, antyalergicznie i przeciwmiażdżycowo. Ekstrakt sojowy, zawierający genisteinę, wykazuje działanie antyproliferacyjne, a za efekt ten może być odpowiedzialna indukcja apoptozy i wzbudzenie różnicowania. Genisteina jest uważana za regulator odpowiedzi zapalnych w skórze. Co ważne, izoflawon ten jest silnym inhibitorem wytwarzania czynników prozapalnych, takich

jak IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , przez modulowanie jądrowego czynnika NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*) i szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*) w makrofagach i komórkach śródbłónka.

Celem realizowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmu działania genisteiny w kontekście modulacji procesów komórkowych, dla potencjalnego jej zastosowania w terapii łuszczycy. W prowadzonych badaniach wykorzystano model *in vitro* poprzez zastosowanie doświadczalnych nienowotworogennych unieśmiertelnionych linii komórkowych keratynocytów człowieka, HaCaT (ang. *spontaneously immortalized human keratinocyte line*). Prowadzone prace eksperymentalne opierały się również na próbie klinicznej w pierwszej fazie badań. Pacjenci dotknięci łuszczycą przez 56 dni przyjmowali genisteinę w formie sproszkowanej w ilości 75 lub 150 mg dziennie, bądź stanowili grupę placebo.

Pierwszym etapem przeprowadzonych prac badawczych było dobranie odpowiednich stężeń genisteiny i określenie jej wpływu na proliferację komórek [2]. Efekt cytotoksyczny genisteiny oszacowano w oparciu o test MTT. Test ten jest oparty na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (MTT, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy). Ilość barwnego zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. W tym celu keratynocyty HaCaT były traktowane genisteiną w stężeniach 30, 60 i 100  $\mu$ M, podawaną w 0,05% roztworze dimetylosulfotlenku (DMSO), stanowiącego rozpuszczalnik, przez 24 i 48 godzin oraz 7 dni. W rezultacie przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że w większości zastosowanych warunków, genisteina nie wykazuje istotnych właściwości cytotoksycznych po traktowaniu keratynocytów przez 24 oraz 48 godzin. Wartości IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> oraz IC<sub>75</sub> (ang. *inhibitory concentration*), określające medialne stężenie inhibitora hamującego odpowiednio 25, 50 oraz 75% proliferację komórek, wyznaczono po 7 dniach traktowania genisteiną. Uzyskane wyniki wskazały, że genisteina hamuje proliferację keratynocytów w sposób zależny od stężenia oraz czasu ekspozycji [2].

Określenie mechanizmu działania genisteiny realizowano, w pierwszej kolejności, w oparciu o analizę wpływu tego izoflawonu na ekspresję genów ludzkich keratynocytów HaCaT [2]. Pomiaru poziomu poszczególnych mRNA dokonano po 24 i 48 godzinnej ekspozycji komórek na 30, 60 lub 100  $\mu$ M genisteinę podawaną w 0,05% roztworze DMSO. Ocenę wpływu genisteiny na transkryptom keratynocytów HaCaT przeprowadzono w oparciu

o technologię mikromacierzy oligonukleotydowych. Do badań wykorzystano macierze HumanHT-12 BeadChip v4.0 firmy Illumina, identyfikujące ponad 25 000 znanych genów. Uzyskane wyniki opracowano poprzez obliczenie stosunku sygnału sondy dla próby traktowanej lekiem względem kontroli traktowanej 0,05% DMSO. Przyjętym kryterium stanowiącym o istotności występujących zmian była wartość stosunku sygnałów wynosząca  $\leq 0,7$  lub  $\geq 1,3$ , dla danej sekwencji. Analiza globalna uwzględniająca przyjęte kryteria wykazała, iż najwięcej genów o modulowanej aktywności odnotowano dla keratynocytów hodowanych przez 24 i 48 godzin w obecności 100  $\mu\text{M}$  genisteiny (4039 geny dla 24 godzin oraz 4186 dla 48 godzin traktowania związkiem) [2].

W dalszym etapie moich badań wykonano analizy ontologiczne identyfikujące szlaki oraz procesy komórkowe modulowane na poziomie transkryptomu przez badany izoflawnon [2]. Wykorzystano w tym celu programy GSEA (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*), GOrilla (ang. *Gene Ontology enRiChment anaLysis and visuaLizAtion tool*) oraz REVIGO (ang. *REduce + VISualize Gene Ontology*). Wśród struktur komórkowych charakteryzujących się największą liczbą genów o zmienionej ekspresji, wyróżniały się przedziały wewnątrzkomórkowe oraz jądrowe. Szlak sygnalizacyjny związany z receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPAR, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*), jak również szlak z udziałem receptorów wewnątrzkomórkowych NOD-podobnych (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) charakteryzowały się odpowiednio najbardziej pozytywnie i negatywnie modulowanym poziomem ekspresji genów keratynocytów hodowanych w obecności 100  $\mu\text{M}$  genisteiny, dla obu analizowanych punktów czasowych (24 i 48 godzin) [2]. Warto dodać w tym miejscu, iż oba szlaki komórkowe są zaangażowane zarówno w rozwój łuszczyca, jak i utrzymanie homeostazy keratynocytów.

Ze względu na szacunkowy charakter uzyskanych danych w analizie mikromacierzowej, konieczna była ich weryfikacja z zastosowaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real time quantitative RT-PCR, real time qRT-PCR*) [2]. Wyniki pozyskane dzięki zastosowaniu obydwu metod wykazały wysoką korelację. Na szczególną uwagę zasługuje, obserwowane w przypadku keratynocytów traktowanych genisteiną, obniżenie poziomu ekspresji genów *PI3* (ang. *peptidase inhibitor 3*) oraz *SERPINB8* (ang. *serpin family B member 8*), będących markerami procesu łuszczykowego komórek epitelmalnych [1, 2].

Jak wspomniano powyżej, łuszczycę charakteryzują trzy główne patomechanizmy: (i) nadmierna proliferacja naskórka, (ii) nieprawidłowe różnicowanie keratynocytów oraz (iii)

stan zapalny. Istotne znaczenie w powstawaniu zmian łuszczycowych przypisuje się ponadto mechanizmom immunologicznym. Pobudzone keratynocyty wykazują zdolność do wytwarzania cytokin i czynników wzrostowych oraz ekspresję różnych antygenów i cząsteczek adhezyjnych charakterystycznych dla komórek efektorowych odpowiedzi immunologicznej. Tym samym keratynocyty wykazują ekspresję genów kodujących białka uczestniczące w procesie zapalnym. W normalnych warunkach większość z czynników immunologicznych nie jest syntetyzowana bądź pozostaje w cytoplazmie, jednakże bodźce zewnętrzne, takie jak uraz, infekcje bakteryjne, substancje chemiczne, promieniowanie ultrafioletowe indukują wytwarzanie i uwalnianie cytokin z keratynocytów [1]. Wstępna analiza transkryptomu komórek linii keratynocytarnej HaCaT, w oparciu o technologię mikromacierzy oligonukleotydowych wykazała, że dotychczas stosowane warunki hodowli powodują niewielkie zmiany w aktywności genów związanych ze stanem zapalnym [2].

Zrozumienie procesów związanych z sygnałami transkrypcyjnymi oraz ścieżkami regulatorowymi, mającymi miejsce w trakcie procesu różnicowania keratynocytów i aktywności immunologicznej skóry stanowi duży potencjał w leczeniu chorób dermatologicznych, obejmujących zaburzenia genetyczne, infekcje, czy raka skóry. Dane literaturowe wskazują na wykorzystanie modeli *in vitro*, opierających się między innymi na bezpośredniej stymulacji cytokinami keratynocytów czy też rekonstrukcje ludzkiego naskórka, stosowane są także kokultury komórek, służące do badań interakcji między ich populacjami. Modele *in vitro* mają na celu mimikowanie szlaków prowadzących do rozwoju zmian łuszczycowych. Stanowią one mniej inwazyjną metodę odwzorowania procesów zachodzących w łuszczycowo zmienionych keratynocytach, dając możliwość testowania potencjalnych środków farmaceutycznych [1].

W związku powyższym faktem, jednym z celów mojej pracy było zaprojektowanie i opracowanie dwuwymiarowego (2D) łuszczycowego modelu naskórka, mimikującego proces zapalny, toczący się w łuszczycowo zmienionych keratynocytach. Konstrukcja modelu opierała się na bezpośredniej stymulacji ludzkiej linii keratynocytarnej HaCaT przez zestaw specjalnie dobranych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1A, IL-17A, IL-22, onkostatyna M (OsM) oraz TNF- $\alpha$ . Bodźce prozapalne wybrano na podstawie raportów literaturowych, w których opisano efekty różnych cytokin zapalnych na keratynocyty. Wykazano między innymi, iż IL-22 hamuje różnicowanie naskórka i indukuje ekspresję białek prozapalnych o właściwościach chemotaktycznych i przeciwbakteryjnych. IL-17 podwyższa poziom ekspresji czynników chemotaktycznych komórek odpornościowych, które są obecne w zmianach łuszczycowych. Ponadto, transkryptom keratynocytów naskórka stymulowanych

IL-1A wykazuje podobieństwo do transkryptomu łuszczycowego. IL-1A i TNF- $\alpha$  wykazują podobne wzory regulacji, zwłaszcza w odniesieniu do ekspresji genów kodujących cytokiny i chemokiny. Izoforny IL-1 są obecne w skórze łuszczycowej. OsM jest silnym aktywatorem keratynocytów, który podobnie jak TNF- $\alpha$ , IL-1A, IL-17 i IL-22, reguluje poziom ekspresji wielu genów dotyczących odporności wrodzonej, angiogenezy, adherencji i migracji komórek układu immunologicznego. Połączone efekty wybranych zatem cytokin wydają się naśladować niektóre cechy łuszczyca [1, 2].

Walidacja otrzymanego 2D łuszczycowego modelu komórkowego naskórka *in vitro* opierała się na analizie poziomu mRNA wyselekcjonowanych genów będących: i) markerami różnicowania keratynocytów, tj. *KRT10* (ang. *keratin 10*), którego poziom ekspresji jest podwyższony ze względu na silną hiperproliferację, towarzyszącą stanom zapalnym skóry, oraz gen późnego różnicowania keratynocytów, *LOR* (ang. *loricrin*), wykazujący obniżoną ekspresję w keratynocytach łuszczycowo zmienionych, a także ii) *S100A7* (ang. *S100 calcium-binding protein A7*) i *S100A9* (ang. *S100 calcium-binding protein A9*), kodujących przeciwbakteryjne peptydy, zaangażowane w nadmierną proliferację oraz stan zapalny skóry [1, 2].

Na podstawie listy genów, przygotowanej w oparciu o dane z bazy KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) oraz AmiGO w toku moich badań, przeprowadziłam szczegółową analizę poziomu ekspresji tych genów, których produkty są zaangażowane w mechanizm łuszczycowy – Panel 1 [2], oraz szlaków uczestniczących w patomechanizmie łuszczyca, których dysfunkcja jest odpowiedzialna za wystąpienie procesu zapalnego w obrębie naskórka – Panel 2 [2, 3]. W przypadku traktowania keratynocytów mieszaniną cytokin prozapalnych, a następnie 100  $\mu$ M genisteiną przez 24 godziny przeanalizowano aktywność 90 genów (sumarycznie dla obu paneli). Badania wykazały, że stosowane warunki hodowli powodują zmianę ekspresji 63 genów, spośród wszystkich testowanych, których to odpowiedź na ekspozycję mieszaniną cytokin prozapalnych i genisteiny można przedstawić za pomocą 5 różnych klastrów. Pierwszą grupę stanowiło 12, drugą zaś 14 genów przedstawiające odpowiednio, zmniejszenie bądź zwiększenie ekspresji w odpowiedzi na traktowanie modelu naskórka mimikującego łuszczycowy proces zapalny genisteiną. Trzeci klaster tworzyły 4 geny, których poziom mRNA po traktowaniu mieszaniną cytokin uległ obniżeniu, a następnie podwyższeniu po genisteinie. Czwarty, najliczniejszy zbiór to 30 genów, które charakteryzowały się podwyższonym poziomem aktywności w keratynocytach stymulowanych mieszaniną cytokin prozapalnych oraz obniżonym poziomem ekspresji po dodatkowym traktowaniu zapalnego

modelu łuszczycowego genisteiną. Ostatni, piąty klaster, przedstawiający niewielkie zmiany w poziomie mRNA w stosowanych warunkach hodowli, stanowiły 3 geny [2].

Zarówno analiza z wykorzystaniem platform mikromacierzowych, jak i qRT-PCR z obrazowaniem w czasie rzeczywistym wykazały, iż genisteina wpływa na ekspresję licznych genów związanych z łuszczycą. Zastosowane kryterium wyznaczające obecność zmian w transkryptomie pozwoliło zidentyfikować geny kodujące białka, które uczestniczą w przekazywaniu sygnału za pośrednictwem ścieżek sygnalizacyjnych: (i) kinaz aktywowanych mitogenami MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), (ii) metabolizmu kwasów tłuszczowych, (iii) rodziny czynników transkrypcyjnych FOXO (ang. *Forkhead box protein O*), (iv) cyklu komórkowego, oraz (v) szlaków metabolicznych [2].

Kolejnym etapem mojej pracy było zbadanie mechanizmów działania genisteiny oraz mieszaniny cytokin, za pośrednictwem których następuje zmiana w fenotypie keratynocytów. W reakcji zapalnej toczącej się w łuszczycowo zmienionej skórze biorą udział cytokiny prozapalne, których ekspresja kontrolowana jest przez regulatorowe czynniki transkrypcyjne, do których należy NF- $\kappa$ B. W niepobudzonej komórce NF- $\kappa$ B znajduje się w cytoplazmie w nieaktywnej formie, która pod wpływem kinaz może ulec aktywacji. Fosforylacja NF- $\kappa$ B p65 i translokacja do jądra komórkowego jest ważnym krokiem dla jego aktywności w procesach transkrypcyjnych. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oznaczona została w niniejszym badaniu z wykorzystaniem metod immunocytochemii. Do prac wykorzystano keratynocyty linii HaCaT poddane traktowaniu mieszaniną cytokin prozapalnych w stężeniu 2 ng/ml każda lub TNF- $\alpha$  (5 ng/ml), wraz z genisteiną (100  $\mu$ M). Kontrolę stanowiły komórki traktowane 0,05% DMSO lub mieszaniną cytokin prozapalnych bądź wortmaniną. Po 24 godzinach dokonano analizy za pomocą mikroskopii florescencyjnej. Efektem tego było obserwowane w toku przeprowadzonych analiz zmniejszenie fosforylacji i translokacji NF- $\kappa$ B po traktowaniu komórek genisteiną, przy czym porównywalne rezultaty uzyskano dla wortmaniny będącej inhibitorem czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz PI3K/AKT (AKT, ang. *protein kinase B*). Analogiczne warunki wykorzystano podczas badań szlaku 3-kinazy fosfatydoinozytolu, w których zastosowano analizator komórek MUSE®, działającego w oparciu o fluorescencyjną detekcję sygnału. Ścieżka sygnałowa z udziałem PI3K/AKT bierze udział w aktywowaniu NF- $\kappa$ B. Kinaza AKT fosforyluje i aktywuje kinazę I $\kappa$ B (IKK, ang. *I $\kappa$ B kinase*), co prowadzi do fosforylacji i degradacji inhibitora I $\kappa$ B, translokacji NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego, a w rezultacie – do transkrypcji genów regulowanych przez ten czynnik. W przeprowadzonych eksperymentach nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian procentowego udziału komórek z aktywowanym oraz

zahamowanym szlakiem. Jednakże, w badaniach transkryptomycznych wykazano istotny wzrost aktywności ekspresji genu *PI3K* w materiale izolowanym z keratynocytów traktowanych mieszaniną cytokin prozapalnych [2].

W dalszych pracach sprawdziłam właściwości inhibicyjne genisteiny wobec czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, poprzez oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz analizatora komórek MUSE® i miana cytokin, to jest: CCL2, IL-1B, IL-8, IL-20 oraz TGF- $\beta$ 1 testem immunoenzymatycznym ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), w keratynocytach poddanych traktowaniu cytokinami prozapalnymi, TNF- $\alpha$  lub lipopolisacharydem (LPS *Escherichia coli* 055:B5), samodzielnie bądź w obecności genisteiny [2]. Zaobserwowano akumulację ROS głównie w keratynocytach traktowanych TNF- $\alpha$  i LPS oraz redukcję reaktywnych form tlenu po zastosowaniu genisteiny. Poziom cytokin CCL2, IL-8 oraz IL-20 w supernatancie komórkowym wskazywał na zmniejszenie ich stężenia w odpowiedzi na stosowany izoflawon. Przedstawione wyniki mogą wskazywać na inhibicyjny charakter genisteiny w ścieżce sygnałowej ROS/NF- $\kappa$ B w keratynocytach mimikujących proces zapalny, toczący się w łuszczycy w warunkach *in vitro* [2].

Ostatnim etapem mojej pracy było kompleksowe zestawienie uzyskanych wyników podczas próby klinicznej pacjentów dotkniętych łuszczycą poddanych leczeniem, genisteiną [3]. Celem przeprowadzonego badania w ramach mojej rozprawy doktorskiej było zwrócenie uwagi na bezpieczeństwo, tolerancję, działanie farmakodynamiczne i skuteczność w leczeniu genisteiną pacjentów z umiarkowaną postacią łuszczycy plackowatej. Wyniki badań przeprowadzone przez klinicystów – dermatologów nie znalazły znaczących dowodów na zależną od genisteiny poprawę wyników klinicznych dotyczących nasilenia łuszczycy, z wyjątkiem wyniku ogólnej oceny lekarskiej pacjenta w skali PGA (ang. *Physician's Global Assessment*) w dwóch dawkach 75 i 150 mg genisteiny i placebo w dniu 56 [3]. Z kolei, w przypadku 4 z 34 pacjentów poddanych próbie klinicznej, nazwanych odpowiednio u.09, 11, 12 i 15, dla pacjenta u.12 zaobserwowano redukcję obu wskaźników, to jest powierzchni i nasilenia łuszczycy – PASI (ang. *Psoriasis Area and Severity Index*) oraz powierzchni ciała –BSA (ang. *Body Surface Area*), z kolei nie stwierdzono zmian w PGA. Co ciekawe, dla tego pacjenta widoczna była pewna regresja fenotypu łuszczycowego, oparta na fotograficznie udokumentowanej ocenie zmian łuszczycowych. Izoflawon był na ogół dobrze tolerowany przez 85% pacjentów randomizowanych i nie wystąpiły żadne poważne działania niepożądane ani przerwanie leczenia. W tym samym czasie nie odnotowano toksyczności ograniczającej dawkę i nie zaobserwowano istotnych zmian parametrów

farmakodynamicznych [3]. Mała skuteczność kliniczna genisteiny może być związana z faktem, że wysokie dawki środka nie dają lepszych efektów niż niskie dawki, ze względu na ograniczone wchłanianie preparatów izoflawonów. Ponadto, częstsze i umiarkowane spożycie genisteiny w ciągu dnia niż pojedyncza wysoka dawka dziennie może być bardziej skuteczne. Chociaż badania sugerują, że genisteina nie ma znaczącego wpływu na poziom mediatorów stanu zapalnego, należy wziąć pod uwagę fakt, że badanie to przeprowadzono analizując jedynie surowicę pacjentów, dlatego może istotne byłoby zbadanie czynników zapalnych również w tkance objętej procesem łuszczycowym, czyli w skórze.

Testując wpływ genisteiny na poziomy transkryptów w bioptatach skóry i komórkach krwi obwodowej czterech pacjentów z łuszczycą, zaobserwowano, iż związek ten modulował aktywność genów kodujących przeciwłuszczycowe i przeciwzapalne mediatory stanu zapalnego [3]. Porównanie ekspresji genów w próbkach skóry i komórkach krwi obwodowej pochodzących od wszystkich trzech pacjentów leczonych genisteiną wykazała różnicę w ich aktywności, podczas gdy nie zaobserwowałam tego w przypadku placebo. Na liście genów, których aktywność była modulowana: dla pacjenta u.09, przyjmującego 75 mg genisteiny, znalazły się 4 transkrypty (*CCL4*, *IL10*, *NFKB1* i *STAT3*) o obniżonym poziomie, dla osobnika u.12 (150 mg genisteiny) były to 2 geny *CXCL10* i *IL6* o zmniejszonej i 1 *IL1RN* zwiększonej aktywności, a w przypadku pacjenta u.15, również stosującego 75 mg genisteiny, był 1 (*IL8*) ze zwiększonym i 1 (*IL10*) z obniżonym poziomem mRNA [3]. Genisteina obniża ekspresję genów o podwyższonej aktywności oraz podwyższa ekspresję genów o obniżonej aktywności w komórkach pobranych od pacjentów poddanych terapii tym związkiem. Ponadto, biorąc pod uwagę badania z wykorzystaniem 2D łuszczycowego modelu komórkowego naskórka *in vitro* stwierdzono, iż 10 transkryptów (tj. *CCL4*, *CXCL1*, *CXCL10*, *IL1A*, *IL6*, *IL8*, *KRT6B*, *PI3*, *SIGIRR* i *ZNF483*) ulega modulacji zarówno w materiale pochodzącym od pacjentów włączonych do próby klinicznej z genisteiną, jak i w materiale z kultur komórkowych traktowanych badanym izoflawonem. Co więcej, rozważania dotyczące oceny modulacji genów zaangażowanych w proces zapalny w łuszczycy w materiale czterech pacjentów pozwalają wnioskować, że genisteina wykazuje potencjał jako środek przeciwzapalny [3].

W związku z realizacją mojej rozprawy doktorskiej, mającej na celu scharakteryzowanie mechanizmu działania genisteiny w kontekście modulacji procesów komórkowych dla potencjalnego jej zastosowania w terapii łuszczycy, przedstawiono właściwości badanego izoflawonu w odniesieniu do modelu ludzkich keratynocytów mimikujących proces zapalny towarzyszący zmianom łuszczycowym w naskórku oraz na

podstawie randomizowanych badań klinicznych. Uzyskane wyniki stanowią dopełnienie istniejącej wiedzy na ten temat, jak i podstawę do dalszych badań. Po raz pierwszy wskazano na inhibicyjny charakter genisteiny w ścieżce sygnałowej ROS/NF-κB w keratynocytach mimikujących proces zapalny toczący się w łuszczycy w warunkach *in vitro*. Badania te stanowią podwaliny do badań podstawowych potencjalnych farmaceutyków z wykorzystaniem opracowanego modelu *in vitro*. W pierwszej fazie próby klinicznej korzyści płynące z genisteiny w terapii łuszczycy dotyczą przede wszystkim bezpieczeństwa. Terapeutycznie genisteina stanowi obiecującą alternatywę, ponieważ jest dobrze tolerowana. Kolejną ważną zaletą tego związku jest droga aplikowania i możliwość samodzielnego podawania. Genisteina może oferować opcję leczenia doustnego pacjentów, którzy zaprzestali leczenia z powodu nieskuteczności, nietolerancji lub zakazu stosowania obecnie dostępnych leków. Jak obecnie obserwujemy, coraz częściej innym aspektem medycznego zastosowania genisteiny jest jej udział w terapii skojarzonej. Z pewnością monoterapia lekami ogólnoustrojowymi jest skuteczna u wielu pacjentów z łuszczycą, jednak niektóre z nich wymagają podejścia łączonego. Z tych powodów aspekty kliniczne i terapeutyczne związane ze stosowaniem genisteiny nadal wymagają głębszego zbadania i przestudiowania.

#### **Literatura:**

1. Bocheńska K., **Smolińska E.**, Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J., Gabig-Cimińska M. (2017) Models in the research process of psoriasis. International Journal of Molecular Sciences, 18: 2514, DOI: 10.3390/ijms18122514. (Pierwszy autor, równorzędnie z Bocheńska K.).
2. **Smolińska E.**, Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J, Węgrzyn G., Banecki B., Szczerkowska-Dobosz A., Purzycka-Bohdan D., Gabig-Cimińska M. (2018) Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT. PLoS ONE, 13: e0192297, DOI: 10.1371/journal.pone.0192297. (Pierwszy autor).
3. **Smolińska E.**, Węgrzyn G., Gabig-Cimińska M. (2019) Genistein modulates gene activity in psoriatic patients. Acta Biochimica Polonica. DOI: 10.18388/abp.2018\_2772. (Pierwszy autor).