

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0207****Genistein a estrogénová signalizácia: sľubná molekula zlepšujúca hojenie rán u postmenopauzálnych žien?**Zodpovedný riešiteľ **prof. PharmDr. Pavel Mučaji, PhD.**Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta
2. Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Univerzita Karlova, 1. lekárska fakulta, Anatomický ústav, Praha, Česká republika
2. Ústav molekulárnej genetiky, Akadémie vied Českej republiky, Praha, Česká republika
3. Univerzita Karlova, 3. lekárska fakulta, Klinika popáleninovej medicíny, Praha, Česká republika

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

nie sú

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Fáber L, Kováč I, Mitrengová P, Novotný M, Varinská L, Vasilenko T, Kello M, Čoma M, Kuruc T, Petrová K, Miláčková I, Kuczmánová A, Perželová V, Mižáková Š, Dosedla E, Sabol F, Luczy J, Nagy M, Majerník J, Koščo M, Mučaji P, Gál P. Genistein Improves Skin Flap Viability in Rats: A Preliminary In Vivo and In Vitro Investigation. *Molecules*. 2018 Jul 4;23(7):1637.
2. Mitrengová P, Mučaji P, Perželová V, Dosedla E, Gál P. Genistein: a promising molecule modulating tumour growth and wound healing? *Ceska Slov Farm*. 2018 Summer;67(1):3-13.
3. Šušaničková I, Puchl'ová M, Lachová V, Švajdenka E, Mučaji P, Smetana K Jr, Gál P. Genistein and Selected Phytoestrogen-Containing Extracts Differently Modulate Antioxidant Properties and Cell Differentiation: an in Vitro Study in NIH-3T3, HaCaT and MCF-7 Cells. *Folia Biol (Praha)*. 2019;65(1):24-35.
4. Lacina L, Čoma M, Dvořánková B, Kodet O, Melegová N, Gál P, Smetana K Jr. Evolution of Cancer Progression in the Context of Darwinism. *Anticancer Res*. 2019 Jan;39(1):1-16.
5. Dosedla E, Gál P, Calda P. Association between deficient cesarean delivery scar and cesarean scar syndrome. *J Clin Ultrasound*. 2020 Nov;48(9):538-543.
6. Lachova V, Mitrengova P, Melegova N, Smetana K Jr, Gal P. Genistein Induces Bcl-2 Expression in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells: a Short Report. *Folia Biol (Praha)*. 2020;66(4):142-147.
7. Čoma M, Lachová V, Mitrengová P, Gál P. Molecular Changes Underlying Genistein

Treatment of Wound Healing: A Review. *Curr Issues Mol Biol.* 2021 May 17;43(1):127-141.
8. Čoma M, Fröhlichová L, Urban L, Zajíček R, Urban T, Szabo P, Novák Š, Fetissov V, Dvořánková B, Smetana K Jr, Gál P. Molecular Changes Underlying Hypertrophic Scarring Following Burns Involve Specific Deregulations at All Wound Healing Stages (Inflammation, Proliferation and Maturation). *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 18;22(2):897.
9. Kaňuchová M, Urban L, Melegová N, Čoma M, Dvořánková B, Smetana K Jr, Gál P. Genistein does not inhibit TGF-beta1-induced conversion of human dermal fibroblasts to myofibroblasts. *Physiol Res.* 2021 Nov 29;70(5):815-820.

Uplatnenie výsledkov projektu

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.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Deprivácia estrogénu je jedným z hlavných faktorov zodpovedných za mnohé procesy súvisiace s vekom vrátane zlého hojenia rán u žien po menopauze. Avšak uvádzané vedľajšie účinky estrogénovej substitučnej terapie (EST) znemožňujú jej široké klinické využitie. Preto boli vyvinuté selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM), ktoré redukovávajú škodlivých vedľajšie účinky EST na prsník a maternicu. Použitie prírodných produktov izolovaných z rastlín (napr. sója) môže predstavovať sľubný zdroj biologicky aktívnych zlúčenín (napr. genisteín) ako účinných alternatív konvenčnej liečby. Genisteín ako prirodzený SERM má jedinečnú schopnosť selektívne pôsobiť ako agonista alebo antagonistu tkanivovo špecifickým spôsobom, t.j. zlepšuje hojenie kože a súčasne vykazuje protinádorové a chemopreventívne vlastnosti (*Curr Issues Mol Biol.* 2021 17;43(1) :127-141). V tejto súvislosti sme sa rozhodli vyhodnotiť ochranný účinok genisteínu, prirodzeného SERM, na hojenie rán u potkanov a v sérii in vitro experimentov na endotelových bunkách, fibroblastoch a keratinocytoch (diferenciácia, migrácia, proliferácia, antioxidačné vlastnosti a profilovanie génových expresných profilov po stimulácii genisteínom). Naše výsledky ukázali, že podávanie genisteínu zvýšilo viabilitu kožných lalokov, ale čo je dôležité, rozdiel je významný len vtedy, keď sa liečba začne 3 dni pred vytvorením laloka (*Molecules.* 2018 Jul 4;23(7):1637). Na základe našich in vitro experimentov možno predpokladať, že základný mechanizmus môže byť skôr sprostredkovaný zvýšením aktivity SOD a expresiou Bcl-2 (*Folia Biol (Praha).* 2020;66(4):142-147). Následne sme porovnávali aj genisteín s rastlinným extraktmi (červenej ďateliny a sóje) obsahujúcimi fytoestrogény. Genisteín vykazoval priamu koreláciu medzi významnými prooxidačnými účinkami pri cytotoxických koncentráciách a takmer žiadnymi prooxidačnými účinkami pri necytotoxických koncentráciách. Okrem toho testovaný extrakt z červenej ďateliny a genisteín indukovali expresiu keratínu-8 (luminálny a prognostický marker pri rakovine prsníka) iba v bunkách MCF-7 (estrogén-pozitívny karcinóm prsníka), ale tento účinok nebol pozorovaný po ošetrení extraktom zo sójových bôbov. Z tohto hľadiska zostáva ešte neobjasnený vplyv konzumácie fytoestrogénov na estrogén-pozitívnu rakovinu prsníka. Tieto údaje ukazujú, že rôzne rastlinné extrakty obsahujúce fytoestrogén a genisteín sú schopné špecificky modulovať antioxidačné vlastnosti a diferenciáciu študovaných buniek. Paralelne sme tiež vykonali profilovanie génovej expresie v endotelových bunkách po stimulácii genisteínom (*Molecules.* 2018 Jul 4;23(7):1637). Spomedzi 84 analyzovaných génov 9 vykazovalo významnú up-reguláciu (\geq dvojnásobný rozdiel; p hodnota $\leq 0,05$) v HUVEC ošetrených genisteínom (100 nM) v prítomnosti VEGF v porovnaní s pozitívnou kontrolou VEGF (tabuľka 2). Je potrebné poznamenať, že po liečbe genisteínom v prítomnosti VEGF sme zistili, že žiadne gény neboli down-regulované v porovnaní s pozitívnou kontrolou VEGF. Analýza podrobne odhalila 9 upregulovaných génov (podporujúce angiogenezu/zápal: CTGF, CXCL5, IL-6, ITGB3, MMP-14 a VEGF-A; inhibícia angiogenezu: COL18A1, TIMP-2 a TIMP-3). Na druhej strane expresia týchto génov nebola

deregulovaná v HUVEC po liečbe genisteínom v neprítomnosti VEGF. Pri tejto liečbe boli v porovnaní s kontrolou down-regulované iba dva gény (CXCL10 a SERPINF1).

Transformujúci rastový faktor beta 1 (TGF-beta1) je pro-fibrotický cytokín s kľúčovou úlohou pri hojení a regenerácii rán, vrátane indukcie prechodu fibroblastov na myofibroblasty.

Ukázalo sa, že genisteín má sľubné antifibrotické vlastnosti. V tomto projekte sme tiež skúmali na proteínovej úrovni, či genisteín moduluje TGF-beta1 (kanonickú a nekanonickú) signalizáciu v normálnych dermálnych fibroblastoch (Physiol Res. 2021 Nov 29;70(5):815-820). Ukázali sme, že TGF-beta1 indukuje fenotyp podobný myofibroblastom v študovanej fibroblastovej signalizácii prostredníctvom kanonických (SMAD) a nekanonických (AKT, ERK1/2, ROCK) dráh. Genisteín indukoval iba expresiu ERK1/2, zatiaľ čo kombinácia TGF-beta1 a genisteínu zoslabovala signalizáciu ERK1/2 a ROCK. Je potrebné poznamenať, že ostatné študované dráhy zostali takmer nedotknuté. Z tohto hľadiska genisteín nezhoršuje konverziu normálnych fibroblastov na bunky podobné myofibroblastom.

V súhrne sme pozorovali ochranný účinok genisteínu na životaschopnosť kožných lalokov a biologické procesy zapojené do hojenia rán, ktoré by mohli byť potenciálne aplikované v plastickej chirurgii u (postmenopauzálnych) žien podstupujúcich rekonštrukčný a/alebo plastický zákrok. Napriek tomu je potrebný ďalší výskum na nájdenie optimálneho liečebného protokolu na použitie v klinickej praxi u ľudí.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

Estrogen deprivation is one of the major factors responsible for many age-related processes including poor wound healing in postmenopausal women. However, the reported side-effects of estrogen replacement therapy (ERT) have precluded broad clinical administration. Therefore, selective estrogen receptor modulators (SERMs) have been developed to overcome the detrimental side effects of ERT on breast and/or uterine tissues. The use of natural products isolated from plants (e.g., soy) may represent a promising source of biologically active compounds (e.g., genistein) as efficient alternatives to conventional treatment. Genistein as natural SERM has the unique ability to selectively act as agonist or antagonist in a tissue-specific manner, i.e., it improves skin repair and simultaneously exerts anti-cancer and chemopreventive properties (Curr Issues Mol Biol. 2021 17;43(1):127-141). In this context, we decided to evaluate the protective effect of genistein, a natural SERM, on wound healing in rats and in a series of in vitro experiments on endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes (differentiation, migration, proliferation, antioxidant properties, and gene expression profiling following genistein treatment).

Our results showed that administration of genistein increased skin flap viability, but importantly, the difference is only significant when treatment is started 3 days prior the flap surgery (Molecules. 2018 Jul 4;23(7):1637). Based on our in vitro experiments, it may be hypothesized that the underlying mechanism may rather be mediated by increasing SOD activity and Bcl-2 expression (Folia Biol (Praha). 2020;66(4):142-147). Subsequently, we also compared genistein with plant extracts (red clover and soy) containing phytoestrogens. Genistein showed a direct correlation between significant pro-oxidative effects at cytotoxic concentrations and almost no pro-oxidative effects at non-cytotoxic concentrations. Moreover, the tested red clover extract and genistein induced keratin-8 (luminal and prognostic marker in breast cancer) expression only in MCF-7 cells, but this effect was not seen following treatment with the soybean extract. From this point of view, the effect of consumption of phytoestrogens in oestrogen-positive breast cancer remains to be elucidated. These data demonstrate that various phytoestrogen-containing plant extracts and genistein are able to specifically modulate antioxidant properties and differentiation of studied cells. In parallel, we also performed gene expression profiling in endothelial cells following genistein treatment (Molecules. 2018 Jul 4;23(7):1637). Among the 84 genes analyzed, 9 showed a significant up-regulation (\geq two fold difference; p value \leq 0.05) in HUVECs treated with genistein (100 nM) in the presence of VEGF compared to VEGF positive control (Table 2). Of note, no genes were found to be down-regulated following genistein treatment in the presence of VEGF compared to VEGF control. In detail, the analysis revealed 9 up-regulated genes (angiogenesis/inflammation promoting: CTGF, CXCL5, IL-6, ITGB3, MMP-14, and VEGF-A; angiogenesis inhibiting: COL18A1, TIMP-2, and TIMP-3). On the other hand, the expression of these genes was not deregulated in HUVECs after treatment with genistein in the absence of VEGF. Under this treatment, only

two genes were down-regulated (CXCL10 and SERPINF1) compared to control. In addition, transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) is a pro-fibrotic cytokine with a key role in wound repair and regeneration, including induction of fibroblast-to-myofibroblast transition. It has been shown that genistein exerts promising anti-fibrotic properties. In the present project we also investigated whether genistein modulates TGF-beta1 (canonical and non-canonical) signaling in normal dermal fibroblasts at the protein level (Physiol Res. 2021 Nov 29;70(5):815-820). We demonstrated that TGF-beta1 induces the myofibroblast-like phenotype in the studied fibroblast signaling via canonical (SMAD) and non-canonical (AKT, ERK1/2, ROCK) pathways. Genistein induced only ERK1/2 expression, whereas the combination of TGF-beta1 and genistein attenuated the ERK1/2 and ROCK signaling. Of note, the other studied pathways remained almost unaffected. From this point of view, genistein does not impair conversion of normal fibroblasts to myofibroblast-like cells. In summary, we observed a protective effect of genistein on skin flap viability and biological processes involved in wound healing which could be potentially applied in plastic surgery to (post-menopausal) women undergoing a reconstructive and/or plastic intervention. Nevertheless, further research is needed to find the optimal treatment protocol for the use in human clinical practice.