

„Indukcja autofagii jako mechanizm działania genisteiny w eksperymentalnej terapii chorób neurodegeneracyjnych”
mgr Karolina Pierzynowska

Mianem chorób neurodegeneracyjnych określa się schorzenia charakteryzujące się postępującą utratą komórek nerwowych [1]. Stanowią one grupę chorób o zróżnicowanej przyczynie (agregacja makrocząsteczek, demielinizacja, stany zapalne, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu), a ich liczbę szacuje się obecnie na kilkaset. Niestety z powodu starzenia się społeczeństwa, częstość występowania tych chorób znacząco wzrasta, a według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organisation*) liczba osób cierpiących na te choroby przekracza obecnie niemal 100 mln na świecie [2, 3].

Przyczyną aż 70% chorób neurodegeneracyjnych jest agregacja makrocząsteczek w komórkach nerwowych, co uszkadza ich prawidłowe funkcjonowanie i prowadzi do wystąpienia poważnych objawów psycho-motorycznych. Niestety, pomimo wielu badań nad nowymi lekami, do tej pory nie udało się zaproponować terapii, która byłaby skuteczna w leczeniu tych schorzeń [2]. Stosowane są natomiast środki farmakologiczne łagodzące ich objawy, rehabilitacja lub terapia antydepresyjna [3].

Obecnie trwają badania nad wieloma strategiami terapeutycznymi, które zakładają między innymi zahamowanie ekspresji genów kodujących patogenne białka lub ich wiązanie i inaktywację albo zahamowanie szlaków prowadzących do apoptozy [3, 4]. Większość z tych strategii jednak nie przynosi oczekiwanych rezultatów podczas pierwszych faz prób klinicznych albo jeszcze podczas badań na modelach zwierzęcych, natomiast terapia genowa, która miałaby zadziałać w przypadku chorób neurodegeneracyjnych o podłożu genetycznym, wydaje się być jeszcze daleką perspektywą [5, 6].

Dlatego coraz większą uwagę zwraca się na strategię zakładającą przyspieszone usunięcie zakumulowanych patologicznych białek z neuronów. W komórkach istnieją dwa szlaki degradacji białek: szlak proteasomalny oraz szlak lizosomalny w procesie zwanym autofagią. Niestety wiele danych literaturowych wskazuje na poważne zaburzenia funkcjonowania proteasomu w przypadku chorób neurologicznych, co zdecydowanie ogranicza możliwość użycia tej ścieżki degradacji czynników patogennych jako potencjalnej terapii [5]. Z tego powodu proces autofagii znalazł się w centrum zainteresowania naukowców i lekarzy pracujących nad leczeniem opisywanych schorzeń. Autofagia jest ewolucyjnie starym, filogenetycznie konserwowanym procesem zachodzącym we wszystkich komórkach eukariotycznych i służącym do degradacji małych organelli komórkowych lub długożyjących, nieprawidłowo funkcjonujących białek. Polega on na otoczeniu błoną izolującą makrocząsteczek przeznaczonych do degradacji, a następnie zamknięciu ich w pęcherzyku zwanym autofagosomem. Autofagosom ulega następnie fuzji z lizosomem tworząc autofagolizosom, a kwaśne hydrolazy lizosomalne trawią wewnątrz pęcherzyka do monomerów, które ponownie zużywane są przez komórkę. Cały molekularny mechanizm procesu autofagii wraz z jego regulacją oraz potencjałem w terapii chorób neurologicznych opisany został przeze mnie w pracy przeglądowej opublikowanej w *Metabolic Brain Disease* [7].

W dalszym ciągu trwają jednak poszukiwania związku, który nie tylko indukowałby proces autofagii ale jednocześnie byłby bezpieczny w długoterminowym stosowaniu (gdyż pacjenci prawdopodobnie będą musieli przyjmować go do końca życia) oraz przekraczałby barierę krew-mózg, co jest szczególnie istotne w przypadku leczenia chorób dotyczących układu nerwowego. Wszystkie te wymagania okazała się spełniać genisteina, jeden z flawonoidów, którego szczególnie duże stężenie

występuje w roślinach strączkowych, głównie w soi. Genisteina wykazuje szereg aktywności biologicznych od działania antynowotworowego po przeciwbakteryjne. Szczególnie ważną informacją okazał się fakt dotyczący aktywacji czynnika transkrypcyjnego EB (TFEB; ang. *transcriptional factor EB*, zwanego inaczej czynnikiem biogenezy lizosomów) przez ten izoflawon, sugerujący indukcję procesu autofagii, co odkryte zostało przy okazji badań nad rzadką chorobą genetyczną – mukopolisacharydozą (w której wykorzystywano zupełnie inny mechanizm działania genisteiny, hamowanie syntezy glikoaminoglikanów w wyniku negatywnej regulacji aktywności kinazy białka EGFR - receptora naskórkowego czynnika wzrostowego) [8, 9]. Szczegółowe badania z użyciem genisteiny na komórkowych oraz zwierzęcych modelach mukopolisacharydozy przyniosły informację o jej bezpieczeństwie i braku efektów niepożądanych, nawet w bardzo wysokich dawkach, oraz przekraczaniu bariery krew-mózg [10, 11].

Zważając na biologiczne właściwości genisteiny oraz pożądane cechy potencjalnego leku na choroby związane z agregacją białek, zasadnym było sprawdzenie czy działanie genisteiny jest skuteczne w potencjalnym leczeniu tej grupy chorób dotykających ośrodkowy układ nerwowy (OUN).

Dlatego celem mojej rozprawy doktorskiej było:

- a) zbadanie wpływu genisteiny na efektywność degradacji białek będących przyczynami dwóch modelowych chorób neurodegeneracyjnych;**
- b) określenie molekularnego mechanizmu działania genisteiny;**
- c) zbadanie wpływu genisteiny na zmiany behawioralne w zwierzęcym modelu wybranej choroby neurodegeneracyjnej.**

W moich badaniach wybrane zostały dwie modelowe choroby neurodegeneracyjne:

- a) choroba Huntingtona (HD; ang. *Huntington's disease*) – jako model rzadkiej choroby jednogenowej, o dobrze poznanej etiologii i autosomalnym dominującym dziedziczeniu;
- b) choroba Alzheimera (AD; ang. *Alzheimer's disease*) – jako model najczęściej występującej choroby neurodegeneracyjnej, o nie do końca poznanej etiologii i dziedziczeniu wieloczynnikowym.

Badania przeprowadzone na modelu choroby Huntingtona

HD jest schorzeniem, którego bezpośrednią przyczyną jest mutacja polegająca na ekspansji trójki nukleotydów CAG w 1 egzonie genu *IT15 (HTT)*. U zdrowych osób liczba tych powtórzeń jest mniejsza od 26, natomiast osoby chore mają ich zazwyczaj 40 lub więcej (przypadki 27-39 powtórzeń stanowią grupę przejściową). Zwiększona liczba powtórzeń CAG skutkuje zwielokrotnieniem liczby reszt glutaminy (ciąg poliQ) w białku huntingtynie (HTT), co uniemożliwia jej prawidłowe fałdowanie się. W konsekwencji zmutowana huntingtyna (mHTT) odkłada się w komórkach w postaci nierozpuszczalnych agregatów upośledzając prawidłowe ich funkcjonowanie [12]. Skutkiem tego jest pojawienie się trzech rodzajów objawów: a) objawów fizykalnych, takich jak nagłe, niekontrolowane, płasawiczne ruchy; spowolnienie ruchowe i dystonia; b) objawów emocjonalnych, takich jak depresja, drażliwość, zmiany osobowości, zespoły obsesyjno-kompulsywne oraz napady agresji; c) zaburzeń poznawczych, takich jak niemożność podjęcia decyzji, skupienia uwagi czy trudności w uczeniu się i zapamiętywaniu. Choroba ma przebieg postępujący i prowadzi do niepełnosprawności oraz śmierci najczęściej wskutek zaburzeń połykania prowadzących do zachłystowego zapalenia płuc [12].

Jedynie przeprowadzone wcześniej badania w tematyce genisteiny oraz HD obejmowały wpływ tego izoflawonu na szczurzy model HD indukowany kwasem 3-nitropropionowym (3-NPA) [13, 14]. Użycie tego modelu nie umożliwia jednak badania pierwotnej przyczyny choroby, gdyż 3-

NPA nie indukuje powstawania mHTT u chorych zwierząt, a naśladuje jedynie wtórne efekty choroby. Tak więc wpływ genisteiny na mHTT nigdy nie był określony.

Jako modelu badawczego użyłam komórek linii HEK-293, które transfekowałam plazmidem zawierającym egzon 1 genu *IT15*, niosący 74 powtórzenia CAG (kodujący zmutowany wariant huntingtyny, mHTT) lub 23 powtórzenia CAG (kodujący zdrowy wariant huntingtyny, HTT). Model ten zastosowano do przeprowadzenia badań wstępnych ponieważ jest to obecnie jedyny model komórkowy umożliwiający przetestowanie działania genisteiny wybiórczo na HTT oraz mHTT (ponieważ HD jest schorzeniem autosomalnym dominującym, to w komórkach pobranych od pacjentów heterozygotycznych znajduje się mieszanina obu wariantów huntingtyny). Takie podejście jest niezwykle ważne, gdyż o ile mHTT prowadzi do zaburzenia wielu aspektów związanych z funkcjonowaniem komórek, to zdrowa HTT pełni w organizmie niezwykle ważne funkcje, bierze bowiem istotny udział w transporcie pęcherzykowym i regulacji transkrypcji, a ma też aktywność anty-apoptotyczną.

Wyniki uzyskane podczas realizacji części mojej rozprawy doktorskiej związanej z HD pokazały, że 48-godzinna inkubacja komórek w obecności genisteiny prowadzi do zdecydowanego obniżenia poziomu agregatów mHTT oraz jego rozpuszczalnej formy, a spadek ten zależy od użytego stężenia tego izoflawnonu. Podobne tendencje zaobserwowałam w liczbie oraz objętości agregatów mHTT. Co ważne i ciekawe, poziom zdrowej formy tego białka pozostawał niezmienny, co z jednej strony jest bardzo pozytywne ze względu na przyszłe wykorzystanie testowanej strategii w terapii, a z drugiej ukazuje autofagię jako pozornie nie-selektywny proces, który jednak w pierwszej kolejności odpowiada za degradację nieprawidłowych makrocząsteczek, nie usuwając białek typu dzikiego. Ponadto, badania z użyciem genisteiny wskazały na jej pozytywny efekt na obniżoną proliferację oraz zwiększoną liczbę komórek apoptotycznych w hodowlach HEK-293 transfekowanych plazmidem kodującym mHTT (w porównaniu do komórek kontrolnych czyli transfekowanych plazmidem kodującym zdrowy wariant HTT).

Uzyskane wyniki stanowiły wstęp do badań nad molekularnym mechanizmem działania genisteiny. Jak już wspomniałam wcześniej, wykryta przy okazji badań nad mukopolisacharydozą aktywacja TFEB przez genisteinę sugerowała, że to proces autofagii jest głównym mechanizmem jej działania. Moja uwaga skupiła się więc na zbadaniu roli tego procesu w obniżeniu poziomu mHTT. Przeprowadzone przeze mnie analizy immunodetekcji markerów autofagii wskazały na znaczący wzrost ich poziomu po inkubacji w obecności genisteiny co świadczyło o efektywnej indukcji autofagii w testowanych komórkach. Wzrostowi poziomu markera autofagii towarzyszył wzrost liczby lizosomów, co pośrednio również dowodzi stymulacji badanego procesu. Pytaniem pozostawało czy spadek poziomu mHTT oraz indukcja autofagii są dwoma osobnymi procesami zachodzącymi obok siebie w komórkach, czy może jeden proces jest konsekwencją drugiego. W celu zbadania czy to proces autofagii odpowiedzialny jest za obniżenie poziomu mHTT pod wpływem genisteiny, użyłam inhibitora autofagii – chlorochiny, której działanie polega na zahamowaniu funkcji lizosomów. Po użyciu chlorochiny zależna od genisteiny degradacja zmutowanej huntingtyny okazała się dużo mniej efektywna, co świadczy o tym, że to autofagia jest odpowiedzialna w dużej mierze za usuwanie patogenego białka z komórek. Wyniki tych badań, opisujące potencjał genisteiny w leczeniu HD oraz mechanizm jej działania, opublikowane zostały w czasopiśmie *Neuromolecular Medicine* [15].

Aby określić czy degradacja mHTT przez genisteinę nie jest wynikiem użytego uprzednio modelu (w którym do komórek dostarczane jest egzogenne, zmutowane białko), badania te przeprowadziłam również na modelu komórek pobranych od pacjentów z HD, w których występuje mieszanina zarówno HTT jak i mHTT. Badania przeprowadziłam na 4 liniach fibroblastów pobranych od pacjentów, charakteryzujących się stwierdzonym podłożem choroby w postaci ciągu powtórzeń

CAG w liczbie 40-43 oraz 4 liniach fibroblastów pobranych od zdrowych, odpowiadających im wiekiem osób (komórki kontrolne). Mikroskopowa wizualizacja HTT wskazała na widoczne agregaty tworzone przez to białko w liniach pobranych od pacjentów z HD, w przeciwieństwie do komórek kontrolnych w których HTT nie tworzyła charakterystycznych skupisk sygnałów powstałych w wyniku wiązania się przeciwciał. Inkubacja komórek HD w obecności genisteiny wskazała na stopniowy zanik agregatów, które w przypadku wysokich stężeń genisteiny nie były już zauważalne.

Bardziej skomplikowane w interpretacji okazały się wykonane przez mnie pomiary samego poziomu HTT w testowanych komórkach. Wykonane analizy techniką Western-blotting wskazały na jej zwiększony poziom w komórkach pobranych od pacjentów, natomiast z powodu braku przeciwciał wiążących się selektywnie do tych dwóch form białka (HTT i mHTT), rozróżnienie wariantu zmutowanej i zdrowej HTT jest niemożliwe. Rozdzielenie ich być może byłoby wykonalne w przypadku większej liczby powtórzeń CAG w egzonie 1 genu *IT15*, co jak najbardziej możliwe jest do zbadania na modelach mysich, gdzie liczba tych powtórzeń potrafi osiągać 160 (dzięki czemu masa zmutowanego białka jest znacznie większa niż masa białka typu dzikiego), jednak w przypadku ludzkich fibroblastów pobranych od pacjentów, u których liczba ta zwykle nie przekracza 45 powtórzeń, jest to mało prawdopodobne. Można by spekulować, że przyczyną zwiększonego poziomu HTT w komórkach pacjentów z HD jest przybieranie przez nią nierozpuszczalnej formy, która nie może zostać usunięta i przez to odkłada się w komórce. Teoria taka byłaby z jednej strony zgodna z danymi literaturowymi na temat nierozpuszczalnych struktur przybieranych przez huntingtynę w konsekwencji pojawienia się wydłużonego ciągu poliQ, a z drugiej strony potwierdza ją fakt, że przyspieszona degradacja lizosomalna w komórkach stymulowana pod wpływem genisteiny usuwa nadmiar HTT do jej poziomu w komórkach kontrolnych (w których poziom HTT pod wpływem genisteiny pozostaje niezmienny).

Wyniki te, opublikowane w *Metabolic Brain Disease* [16], nie tylko stanowią potwierdzenie rezultatów badań wykonanych na modelu komórek HEK-293 transfekowanych plazmidowym DNA kodującym dwa warianty HTT, ale również wskazały na efektywność działania genisteiny na bardziej skomplikowanym modelu, jednocześnie jednak lepiej odpowiadającym warunkom klinicznym. Natomiast interpretacja tych wyników jest znacznie bardziej złożona.

Badania przeprowadzone na modelu choroby Alzheimera

Przyczyną AD jest akumulacja toksycznych form β -amyloidu (β A) tworzącego płytki amyloidowe oraz hiperfosforylowanego białka tau (P-tau) będącego głównym składnikiem splątków neurofibrylarnych w strukturach OUN, głównie w obszarze kory mózgu, hipokampa oraz ciała migdałowatego [17, 18]. Prekursorem β -amyloidu jest białko APP (ang. *amyloid precursor protein*), które ulega przemianom proteolitycznym do β -amyloidu pod wpływem działania sekretaz. Nieznana jest jednak konkretna przyczyna akumulacji β -amyloidu oraz P-tau w OUN. Dane literaturowe dostarczają informacji na temat wykrytych mutacji w genie kodującym białko APP w pobliżu miejsc cięcia przez sekretazy lub w genach kodujących same sekretazy. Dane te dotyczą jednak tylko rodzinnej postaci AD, mającej podłoże genetyczne. Przyczyny akumulacji tych białek w przypadku postaci sporadycznej (nie uwarunkowanej genetycznie) pozostają nieznanne [17, 18]. Do głównych objawów choroby zaliczamy zaburzenia myślenia abstrakcyjnego czy uszkodzenie pamięci semantycznej (wczesne stadia) oraz trudności językowe, zaburzenia pamięci długotrwałej i zmiany osobowości (późne stadia). Chorzy wyłącza się z życia społecznego i rodzinnego. Stopniowo tracą oni funkcje życiowe, co prowadzi do śmierci najczęściej w ciągu 7 lat od postawienia diagnozy [17, 18, 19].

Należy nadmienić, że badania z udziałem genisteiny w AD były już przeprowadzane na różnych modelach. Mimo, że autorzy niektórych prac pokazują interesujące wyniki, należy wziąć pod uwagę, że żadne z tych doniesień nie wspomina nawet o autofagii jako o mechanizmie działania genisteiny. Niektóre z tych prac koncentrowały się na apoptozie [20], działaniach przeciwzapalnych [21] lub właściwościach antyoksydacyjnych tego izoflawonu [22]. Zaplanowane przeze mnie eksperymenty koncentrowały się na całkowicie odmiennej aktywności genisteiny. Badania te po pierwszy wskazały autofagię jako mechanizm działania genisteiny w obniżaniu poziomu β A lub P-tau (co nigdy wcześniej nie zostało zaproponowane) oraz pozwoliły określić wpływ genisteiny podawanej w dawce stymulującej proces autofagii na efektywność leczenia w modelach AD (w opublikowanych wcześniej doniesieniach zastosowane zostały dużo mniejsze dawki).

Niestety dostępność wiarygodnych komórkowych modeli AD jest bardzo ograniczona, przez co zdecydowałam się na przeprowadzenie badań od razu na modelu zwierzęcym. Pracowałam na szczurzym modelu AD indukowanym streptozotocyną (STZ). STZ jest pochodną glukozaminy i nitrozomocznika produkowaną naturalnie przez bakterie *Streptomyces achromogenes*. Podana szczurom dokomorowo wnika do komórek przy pomocy receptora GLUT-2 przyczyniając się do powstawania reaktywnych form tlenu, stanu zapalnego (występowanie tych zjawisk stwierdzono również w ludzkiej postaci choroby) oraz ostatecznie – akumulacji płytek amyloidowych złożonych z β A oraz splątków neurofibrylarnych złożonych z P-tau. W konsekwencji zaburzona zostaje transmisja cholinergiczna, co prowadzi do neurodegeneracji głównie obszaru hipokampa skutkując znacznym deficytem procesów pamięciowych. Model ten jest dobrze udokumentowanym, reprezentatywnym modelem AD [23].

Szczury rasy Wistar, podzielone zostały na 4 grupy:

- 1) VEH+WODA: z dokomorową iniekcją rozpuszczalnika dla STZ, którym podawano wodę (n=12);
- 2) VEH+GEN: z dokomorową iniekcją rozpuszczalnika dla STZ, którym podawano genisteinę (n=12);
- 3) STZ+WODA: z dokomorową iniekcją STZ, którym podawano wodę (n=12);
- 4) STZ+GEN: z dokomorową iniekcją STZ, którym podawano genisteinę (n=12).

Po 2-tygodniowym oswojeniu zwierząt z osobą eksperymentatora (ang. *handling*), szczury poddane zostały operacji, podczas której wykonano dokomorową iniekcję STZ/rozpuszczalnika dla STZ. Po 2-dniowym okresie rekonwalescencji rozpoczęto suplementację wodą (grupy kontrolne) lub genisteiną w dawce 150 mg/kg/dzień (dawka indukująca proces autofagii; dane zaczerpnięte z doświadczeń na zwierzęcym modelu mukopolisacharydoz).

Badania behawioralne

Miesiąc po zabiegu iniekcji STZ lub rozpuszczalnika (kontrola) przeprowadzono szereg testów behawioralnych mających na celu ocenę aktywności lokomotorycznej szczurów, pomiar nasilenia lęku czy, szczególnie ważny przy AD, pomiar pamięci długotrwałej.

Aktywność lokomotoryczną szczurów mierzyłam w aktometrach poprzez zsumowanie liczby ich ruchów horyzontalnych, wertykalnych oraz ambulatoryjnych podczas okresu 2 h. Wyniki pomiaru pokazały, że zwierzęta po iniekcji STZ charakteryzują się znaczną nadaktywnością ruchową. Natomiast podawanie genisteiny tym zwierzętom przez okres miesiąca całkowicie znosi ten fenotyp chorobowy sprawiając, że zwierzęta te stawały się nieodróżnialne od zwierząt kontrolnych (zdrowych). Wyniki pomiaru nasilenia lęku (przy pomocy testu uniesionego labiryntu krzyżowego) wykazały, że szczury chore na AD, którym podawano genisteinę wykazują naturalne zachowania

lękowe w przeciwieństwie do szczurów nie leczonych, u których fizjologiczny lęk przed wysokością i przestrzenią jest zredukowany. Najbardziej obszerną oraz najważniejszą częścią badań behawioralnych są rezultaty testu pomiaru pamięci, którą zweryfikowałam przy pomocy Labiryntu Wodnego Morrisa. Wynikami otrzymanymi podczas wykonywania tego testu udowodniłam, że pamięć u szczurów poddanych terapii genisteiną jest identyczna jak pamięć szczurów kontrolnych (zdrowych), podczas gdy szczury po iniekcji STZ cierpią na poważne zaburzenia kognitywne.

Badania biochemiczne

Wyniki uzyskane podczas badań biochemicznych na materiale tkankowym pobranym od szczurów *post mortem* wykazały, że u zwierząt poddanych iniekcji STZ poziom APP, β A oraz P-tau jest podwyższony nawet 4-krotnie. Jednak u grupy chorych zwierząt, którym podawano genisteinę poziom wszystkich wymienionych wyżej białek jest obniżony do poziomów tych białek u szczurów kontrolnych (Western blotting) lub prawie niewykrywalny (immunohistochemia) we wszystkich badanych strukturach mózgowia tj. hipokampie, korze oraz reszcie mózgowia. Podobne wyniki uzyskano podczas detekcji krótkich odcinków β A (β A40 i 42), które obecnie uważane są za najbardziej toksyczne dla komórek nerwowych.

Przechodząc do mechanizmu działania genisteiny należy podkreślić, że immunodetekcja markerów procesu autofagii wykazała ich podwyższony poziom u obu grup szczurów, którym podawana była genisteina (zarówno zdrowych jak i chorych na AD), co świadczy o wydajnej indukcji autofagii pod wpływem tego izoflawonu. U grup tych zaobserwowano również zwiększoną liczbę lizosomów.

Początkowy problem stanowiło zbadanie czy to proces autofagii odpowiedzialny jest za obniżenie poziomu APP i β A pod wpływem genisteiny. W przypadku modeli zwierzęcych nie możliwe jest bowiem zahamowanie pewnych procesów (choćby autofagii co zostało wykonane podczas badań nad komórkowym modelem HD) gdyż zakończyłyby się one śmiercią zwierzęcia. Zatem w celu sprawdzenia czy genisteina powoduje degradację APP i β A poprzez indukcję procesu autofagii, przeprowadziłam badania na modelu komórek HEK-293, transfekowanych plazmidem zawierającym gen kodujący białko APP. Należy zwrócić uwagę na fakt, że nie ma dostępnych plazmidów niosących gen kodujący zmutowany wariant APP, skorzystałam więc z plazmidu z genem kodującym APP typu dzikiego. Nawet gdyby możliwe było przeprowadzenie doświadczeń z plazmidem z genem kodującym zmutowany wariant APP to warto pamiętać, że mutacje w APP stanowią przyczynę tylko części przypadków z rodzinnie uwarunkowaną AD (która sama w sobie powoduje tylko 15% zachorowań na AD, reszta dotyczy postaci sporadycznej). Pozostałe mutacje dotyczą genów kodujących sekretazy, a wykorzystanie tego aspektu i próby transfekcji komórek plazmidowym DNA z genem kodującym zmutowane warianty sekretaz stworzyłoby niezwykle skomplikowany układ, który w tym momencie traciłby na wiarygodności. Ewentualne uzyskanie komórek z defektami w genach kodujących sekretazy możliwe by było w przypadku wykorzystania techniki CRISP/Cas9. Modele tego typu są na razie bardzo rzadko wykorzystywane w badaniach nad AD i w dalszym ciągu stanowiłyby one model do badań tylko części przypadków tej choroby.

Komórki HEK-293 transfekowane plazmidem kodującym APP inkubowałam w obecności genisteiny oraz genisteiny i chlorochiny przez okres 24 h. Wyniki wykazały znaczne obniżenie poziomu APP oraz β A pod wpływem genisteiny w porównaniu do komórek kontrolnych, natomiast zahamowanie funkcji lizosomów przez chlorochinę skutkowało zwiększonym poziomem tych białek co sugeruje, że w modelu AD, podobnie jak w przypadku HD to właśnie autofagia jest mechanizmem odpowiedzialnym za degradację tych toksycznych białek pod wpływem genisteiny. Wyniki części mojej pracy doktorskiej dotyczącej badań na szczurzym modelu AD opisane zostały w artykule opublikowanym w *Neuropharmacology* [24].

Podsumowując, wyniki powstałe podczas realizacji mojej rozprawy doktorskiej wskazały na duży potencjał genisteiny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, ze względu na jej skuteczność w degradacji patogennych białek będących przyczynami tych chorób w wyniku indukcji procesu autofagii. Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe na temat genisteiny, a konkretnie bezpieczeństwo jej stosowania w wysokich dawkach i przekraczanie przez nią bariery krew-mózg, można śmiało stwierdzić, że genisteina spełnia wszystkie wymogi stawiane terapeutom tej grupy schorzeń neurologicznych.

Literatura

1. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113: 1250-1256.
2. Geerts H, Gieschke R, Peck R (2018) Use of quantitative clinical pharmacology to improve early clinical development success in neurodegenerative diseases. *Expert Rev Clin Pharmacol* 11 :789-795.
3. Anderson KM, Mosley RL (2016) Therapeutic strategies in neurodegenerative diseases. W: *Neuroimmune Pharmacology* (Ikezu T, Gendelman HE, red.), Springer, Berlin-Heidelberg, str. 681-711.
4. Chen X, Pan W (2014) The treatment strategies for neurodegenerative diseases by integrative medicine. *Integr Med Int* 1: 223-225.
5. Young AB (2009) Four decades of neurodegenerative disease research: How far we have come! *J Neurosci* 29: 12722–12728.
6. Mullane K, Williams M (2018) Alzheimer's disease (AD) therapeutics - 1: Repeated clinical failures continue to question the amyloid hypothesis of AD and the current understanding of AD causality. *Biochem Pharmacol* 158: 359-375.
7. **Pierzynowska K, Gaffke L, Cyske Z, Puchalski M, Rintz E, Bartkowski M, Osiadly M, Pierzynowski M, Mantej J, Piotrowska E, Węgrzyn G (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metab Brain Dis* 33: 989-1008.**
8. Moskot M, Montefusco S, Jakóbkiewicz-Banecka J, Mozolewski P, Węgrzyn A, Di Bernardo D, Węgrzyn G, Medina DL, Ballabio A, Gabig-Cimińska M (2014) The phytoestrogen genistein modulates lysosomal metabolism and transcription factor EB (TFEB) activation. *J Biol Chem* 289: 17054-17069.
9. Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Kloska A, Smolińska E, Mozolewski P, Malinowska M, Rychłowski M, Banecki B, Węgrzyn G, Gabig-Cimińska M (2015) Modulation of expression of genes involved in glycosaminoglycan metabolism and lysosome biogenesis by flavonoids. *Sci Rep* 2015 5: 9378.
10. Kim KH, Dodsworth C, Paras A, Burton BK (2013) High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Mol Genet Metab* 109: 382-385.
11. Tsai TH (2005) Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J Chromatogr A* 1073: 317-322.
12. Shannon KM, Fraint A (2015) Therapeutic advances in Huntington's Disease. *Mov Disord* 30: 1539-1546.

13. Menze ET, Esmat A, Tadros MG, Abdel-Naim AB, Khalifa AE (2015) Genistein improves 3-NPA-induced memory impairment in ovariectomized rats: impact of its antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase modulatory properties. *PLoS One* 10: e0117223.
14. Menze ET, Esmat A, Tadros MG, Khalifa AE, Abdel-Naim AB (2016) Genistein improves sensorimotor gating: Mechanisms related to its neuroprotective effects on the striatum. *Neuropharmacology* 105: 35-46.
15. **Pierzynowska K, Gaffke L, Hać A, Mantej J, Niedzialek N, Brokowska J, Węgrzyn G (2018) Correction of Huntington's disease phenotype by genistein-induced autophagy in the cellular model. *Neuromolecular Med* 20: 112-123.**
16. **Pierzynowska K, Gaffke L, Cyske Z, Węgrzyn G (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients. *Metab Brain Dis* DOI: 10.1007/s11011-019-00405-4.**
17. Arendt T, Stieler JT, Holzer M (2016) Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* 126: 238-292.
18. Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM (2016) A Greek tragedy: the growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein roteolysis. *J Biol Chem* 291: 19235-19244.
19. Naj AC, Schellenberg GD; Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC) (2017) Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 174: 5-26.
20. Wang Y, Cai B, Shao J, Wang TT, Cai RZ, Ma CJ, Han T, Du J (2016) Genistein suppresses the mitochondrial apoptotic pathway in hippocampal neurons in rats with Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 11: 1153-1158.
21. Zhou X, Yuan L, Zhao X, Hou C, Ma W, Yu H, Xiao R (2014) Genistein antagonizes inflammatory damage induced by β -amyloid peptide in microglia through TLR4 and NF- κ B. *Nutrition* 30: 90-95.
22. Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M (2011) Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β (1-40) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 95: 270-276.
23. Ravelli KG, Rosário BD, Camarini R, Hernandez MS, Britto LR (2017) Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer's disease: neurochemical and behavioral characterization in mice. *Neurotox Res* 31: 327-333.
24. **Pierzynowska K, Podlacha M, Gaffke L, Majkutewicz I, Mantej J, Węgrzyn A, Osiadly M, Myślińska D, Węgrzyn G (2019). Autophagy-dependent mechanism of genistein-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 148: 332-346.**