CYTOKININY, ICH AKTYWNOŚĆ BIOCHEMICZNA W PROCESACH PODZIAŁÓW, STARZENIA SIĘ I APOPTOZY KOMÓREK LUDZKICH I ZWIERZĘCYCH

CYTOKININS, THEIR BIOCHEMICAL ACTIVITY IN DIVISION PROCESS, AGEING AND APOPTOSIS IN HUMAN AND ANIMAL CELLS

Agata JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, Romuald CZERPAK

Zakład Nauk Biologicznych, Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku

Streszczenie: Cytokininy stanowią jedną z głównych grup hormonów roślinnych. Stymulują one procesy anaboliczne, wzrost i podziały komórek. Pierwszą odkrytą cytokininą była kinetyna, czyli N-6-furfuryloadenina. Kinetyna jest ważnym komponentem ścieżki metabolicznej, która umożliwia komórce pozbycie się nadmiaru wolnych rodników. Jest to odpowiedź na stres oksydacyjny. W komórkach roślinnych we frakcji cytosolowej, mikrosomalnej i błonach tylakoidów występują białka wiążące cytokininy – CBP (ang. *Cytokinin Binding Protein*). Związanie się z nimi cytokininy indukuje określoną odpowiedź fizjologiczną. Kinetyna uważana jest za silny inhibitor procesów oksydacji i glikozylacji białek i kwasów nukleinowych *in vitro*. Jest ona silnym antyoksydantem, zarówno *in vitro* jak i *in vivo,* opóźnia procesy starzenia się ludzkich komórek w kulturach komórkowych *in vitro*. Kinetyna wpływa na wzrost i kształt komórek, tempo ich wzrostu, strukturę cytoszkieletu, syntezę makromolekuł i zawartość lipofuscyny. Działa ona korzystnie na skórę, poprawia funkcje barierowe warstwy kolczystej, zmniejsza utratę wody przez naskórek – TEWL (ang. *Transepidermal Water Loss*) i poprawia koloryt skóry. Zarówno kinetyna, jak i jej rybozyd wykazują cytotoksyczność względem komórek czerniaka. Kolejną cytokininą jest N-6-benzyloadenina. Wpływa ona głównie na podziały komórek. Ma również zdolność hamowania niektórych ludzkich kinaz białkowych, włącznie z CDKs. Jest to ważne zwłaszcza w komórkach nowotworowych. Pochodne benzyloadeniny stymulują apoptozę w komórkach nowotworowych w różnych typach nowotworów. N-9-benzyloadenina hamuje aktywność fosfodiesteraz (PDE). Ponadto w kulturach fibroblastów wykazano, że pochodne N-6-benzyloadeniny indukują wydłużanie komórek, osłabienie ich ruchów i zwiększenie adhezji do podłoża.

Słowa kluczowe: cytokininy, kinetyna, benzyloadenina, hormony.

Summary: Cytokinins are one of the main group of plant hormones. They stimulate anabolic processes and cells growth and divisions. First invented cytokinin was kinetin, N-6-furfuryloadenine. Kinetin is important component of metabolic pathway, which enable cells to release excess free radicals. This is response to oxidative stress. Cytokinin binding proteins (CBP) can be found in plant cells, especially in cytosol, microsomes and thylacoid membranes. Cytokinins combined with CBP cause certain physiological response. Kinetin is a strong inhibitor of proteins and nucleic acids oxidation and glycosylation *in*

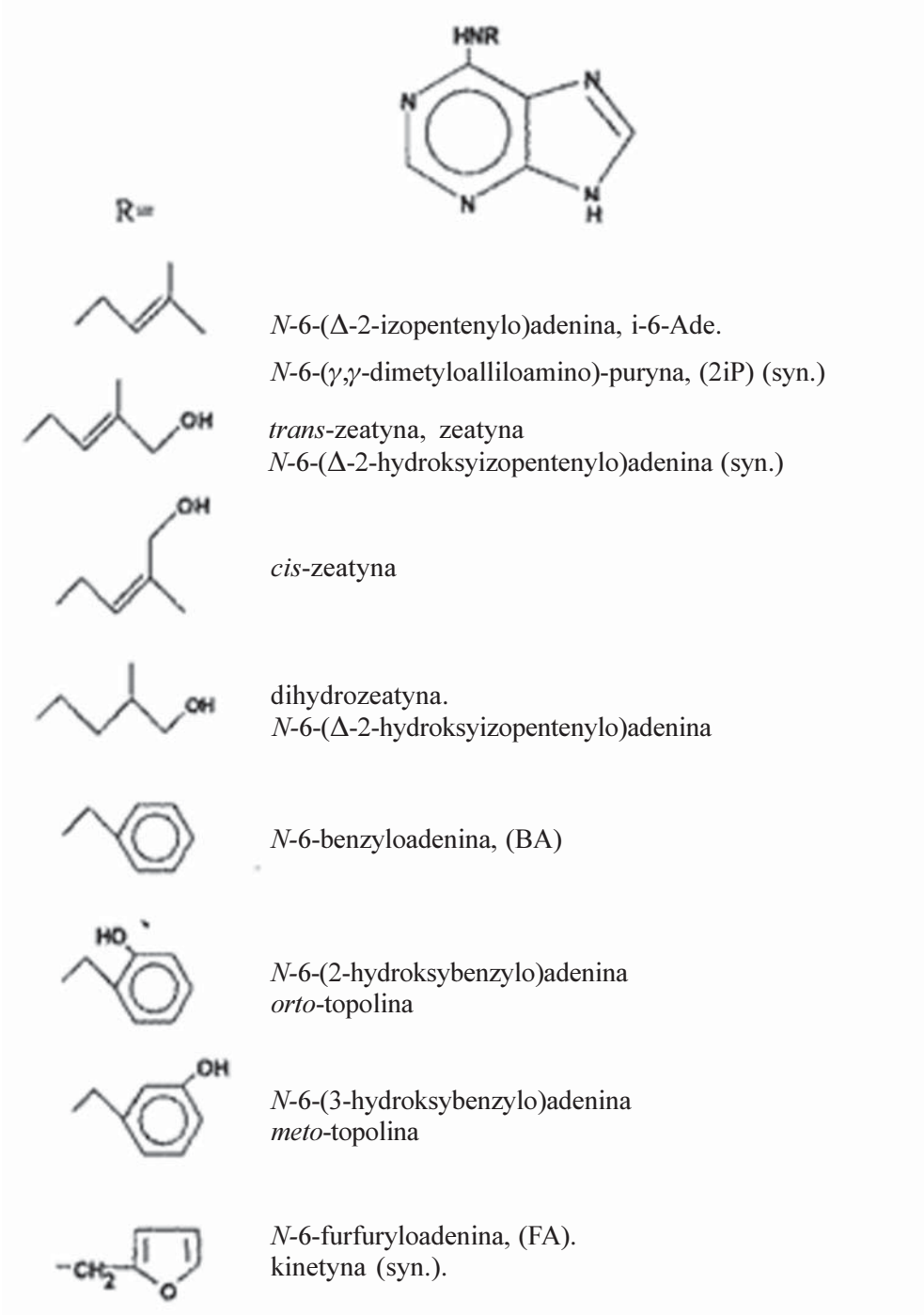
vitro. It is a strong antioxidant both *in vitro* and *in vivo*. It delays the onset of human cells ageing in cell culture *in vitro*. Kinetin influences on cell growth and shape, rate of their growth, cytoskeleton structure, macromolecules biosynthesis and lipofuscin content. It acts favorably on skin, enhances barier functions of *stratum corneum*, decreases TEWL (Transepidermal Water Loss) and improves skin colour. Both kinetin and its ribosides are cytotoxic to melanoma cells. Another cytokinin is N-6-benzyloadenine. It influences mainly on the cell divisions. It can also inhibit some of human kinases, including CDKs (Cyclin Dependent Kinases). It is important especially for cancer cells. Benzyloadenine derivatives stimulate apoptosis in many types of cancer cells. N-9-benzyladenine inhibits phosphodiesterases (PDE) activity. Furthermore, it was shown in fibroblasts culture that N-6-benzyladenine derivatives stimulate cells elongation, decreasing of their movement and increase of their adhesion to medium.

Key words: cytokinins, kinetin, benzyladenine, hormones.

1. WSTĘP

Jedną z głównych grup hormonów roślinnych stymulujących procesy anaboliczne oraz wzrost i podziały komórek są cytokininy. Stymulują one cytokinezę, kariokinezę, replikację, transkrypcję, translację oraz transport aktywny przez błony komórkowe. Potwierdzone jest też ich działanie hamujące aktywność enzymów, które rozkładają kwasy nukleinowe i białka, czyli opóźniają procesy starzenia się komórek. Cytokininy przyspieszają także procesy regeneracyjne tkanek oraz wydłużają cykl rozwojowy komórek. Stymulują biosyntezę kwasów nukleinowych i tworzenie natywnej struktury białek. Wbudowując się w sąsiedztwie antykodonu tRNA lub w jego pętli bocznej oraz we fragmencie poliadenylowym mRNA przyspieszają odczytywanie kodonów znajdujących się w mRNA przez komplementarne antykodony zlokalizowane w tRNA z przyłączonym aminokwasem. Oddziałują również na proces translacji na etapie inicjacji i elongacji poprzez aktywację syntazy aminoacylowej i aminoacylotransferaz. Również korzystnie wpływają na strukturę chemiczną komponentów błon komórkowych przyspieszając biosyntezę lipidów i protein błonowych oraz poliamin, fitosteroli i cyklitoli.

Cytokininy są pochodnymi zasady purynowej adeniny, w której do grupy aminowej znajdującej się przy atomie węgla C-6 przyłączony jest najczęściej pięciowęglowy, izoprenowy łańcuch alifatyczny, a rzadziej aromatyczny podstawnik benzylowy w różnych modyfikacjach chemicznych (ryc.1). W roślinach najpowszechniej występują cytokininy z podstawnikami alifatycznymi, takie jak: zeatyna, dihydrozeatyna i ich różne modyfikacje z podstawnikami hydroksylowymi lub metylowymi. Cytokininy z aromatycznym podstawnikiem benzylowym, takie jak benzyloadenina, są rzadziej spotykane. Do tej grupy związków zalicza się również *m*- i *o*-topolinę, czyli *m*- i *o*-hydroksybenzyloadeninę. Znane są syntetyczne analogi cytokinin adeninowych, takie jak: N-6-farnezyloadenina, N-6-geranyloadenina i N-6-furfuryloadenina (kinetyna), która jest jedną z najbardziej aktywnych biologicznie cytokinin. W komórkach roślinnych cytokininy występują zwykle w postaci połączeń N-glikozydowych lub w formie wolnych zasad. Jeżeli wykrywane są w postaci połączeń N-glikozydowych, to zwykle z β-D-rybozą, rzadziej z β-D-glukozą, a sporadycznie z β-D-ksylozą z azotem w pozycji N6 lub N7. Łącząc się z rybozą



N-6-(Δ-2-izopentenylo)adenina, i-6-Ade.

N-6-(*γ*,*γ*-dimetyloalliloamino)-puryna, (2iP) (syn.)

trans-zeatyna, zeatyna
N-6-(Δ-2-hydroksyizopentenylo)adenina (syn.)

cis-zeatyna

dihydrozeatyna.
N-6-(Δ-2-hydroksyizopentenylo)adenina

N-6-benzyloadenina, (BA)

N-6-(2-hydroksybenzylo)adenina
orto-topolina

N-6-(3-hydroksybenzylo)adenina
meto-topolina

N-6-furfuryloadenina, (FA).
kinetyna (syn.).

RYCINA 1. Chemiczna struktura pospolitych wolnych form cytokinin pochodnych adeniny [13]
FIGURE 1. Chemical structure of common, free cytokinins, adenine derivatives [13]

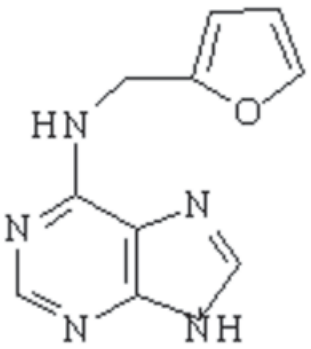
tworzą rybozyd, a po przyłączeniu do niego kwasu ortofosforowego przekształcają się w mononukleotyd zwany rybotydem. Nukleotydy te występują w sąsiedztwie antykodonu i pętli bocznej tRNA, fragmencie poliadenylowym mRNA oraz w rRNA, gdzie spełniają one rolę regulacyjną o charakterze stymulującym w procesie translacji. Największą aktywnością biologiczną charakteryzują się cytokininy w formie wolnych zasad i połączeń rybozydowych. Stymulacyjna aktywność cytokinin zależy przede wszystkim od charakteru chemicznego podstawnika w pozycji N6. Aktywność cytokinin z podstawnikiem alifatycznym jest uwarunkowana długością łańcucha, liczbą i rozmieszczeniem w nim wiązań podwójnych oraz dodatkowo przyłączoną grupą hydroksylową bądź metylową. Zeatyna jest przykładem związku, który ma pięciowęglowy łańcuch pochodny izoprenu z wiązaniem podwójnym w środku cząsteczki i przyłączoną do czwartego atomu węgla grupą hydroksylową. Wprowadzenie dodatkowych podstawników do cytokinin, np. do azotu grupy aminowej lub bezpośrednio do pierścienia purynowego wpływa niekorzystnie na ich działanie stymulujące procesy biochemiczno-fizjologiczne. Cytokininy zawierające podstawnik aromatyczny, (np. N-6-benzyloadenina) bądź heterocykliczny (np. kinetyna) wykazują największą aktywność biologiczną wówczas, gdy mają tylko jeden jednowęglowy mostek alkilowy przy azocie N6 grupy aminowej adeniny. Modyfikacje chemiczne w tej grupie związków, polegające na wprowadzeniu do grupy aminowej, a zwłaszcza do pierścienia zasady purynowej, dodatkowych podstawników, takich jak: chlorowce, grupy sulfhydrylowe, azowe, aminowe lub inne, powoduje wytworzenie się silnych właściwości antycytokininowych, hamujących wzrost, podziały i metabolizm komórek. Wykazano również działania mutagenne tak zmodyfikowanych związków [12, 13, 46].

2. STRUKTURA, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE I MECHANIZMY TWORZENIA SIĘ KINETYNY

Pierwszą wykrytą i jak dotąd najlepiej poznaną cytokininą jest kinetyna (N-6-furfuryloadenina) (ryc. 2). Po raz pierwszy została wyizolowana z DNA plemników śledzi w 1955 r. i przez długi czas uważano ją za artefakt powstający w procesach przebudowy DNA. W 1996 r. stwierdzono występowanie kinetyny w komercyjnie dostępnym DNA, w świeżo wyekstrahowanym z ludzkich komórek DNA, w ekstraktach z komórek roślinnych i ludzkim moczu [3, 7, 37, 38].

Kinetyna jest związkiem amfoterycznym o pKa wynoszącym 4 i 10. Jest ona rozpuszczalna w stężonych kwasach, zasadach, częściowo w etanolu, butanolu, acetonie i eterach, a praktycznie nierozpuszczalna w wodzie destylowanej. Sublimuje w 220°C przy ciśnieniu atmosferycznym (1013,25 hPa). Molekularna konformacja kinetyny może być rozpatrywana w dwojaki sposób: poprzez strukturę reszty adeninowej lub poprzez strukturę grupy furfurylowej. Kąt pomiędzy tymi dwoma strukturami wynosi 79°. Ponieważ podstawnik przy N(6) jest znacznie oddalony od pierścienia imidazolowego, wiązania wodorowe typu Watson-Crick nie są obecne w krystalograficznej strukturze zasady purynowej. Natomiast orientacja podstawni-

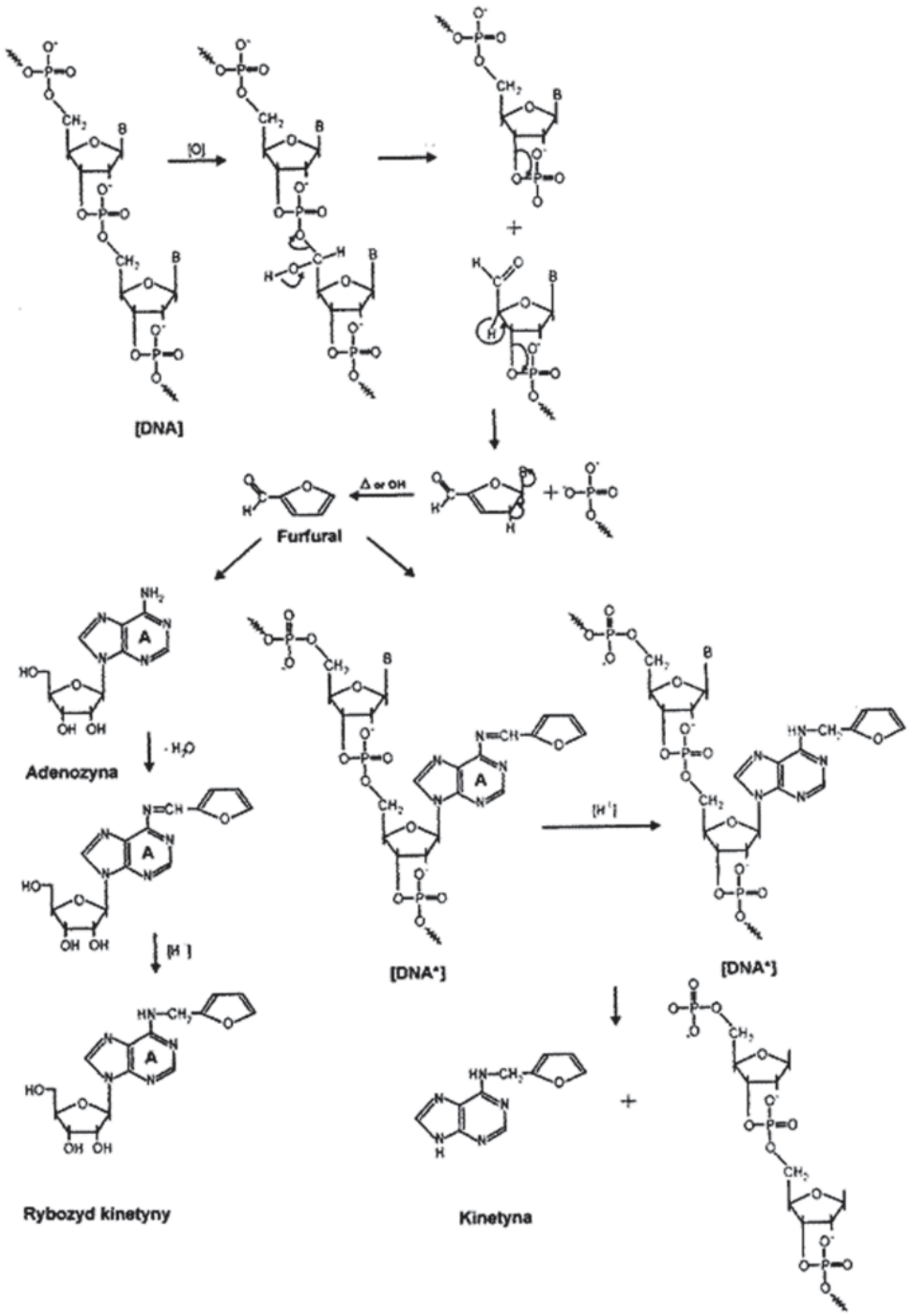
ków prowadzi do parowania zasad wg Hoogsteena przez krystalograficzne centra inwersji i tworzenie wiązań wodorowych N6-H…N7 i N9-H…N3, które w rezultacie dają zasady purynowe połączone w postaci wstążki z wystającymi pierścieniami furfurylowymi. Odległy układ podstawników N(6) w stosunku do pierścienia imidazolowego jest podobny do innych N(6) pochodnych adeninowych. Interesującą konsekwencją obecności wiązań typu Hoogsteena jest wiązanie wodorowe pomiędzy C(8)-H(8)…0(15) o 2.64Å. Każdy podstawnik na pozycji N1 znacząco ogranicza wolną przestrzeń w konformacji wiązania N6-CH_2 z powodu sferycznego odpychania tej pozycji [5].



RYCINA 2. Kinetyna – wzór strukturalny
FIGURE 2. Kinetin – chemical structure

Znany jest fakt, że adenina w wodzie o temperaturze pokojowej występuje jako mieszanina dwóch izomerów: 7H (22%) i 9H (78%). W warunkach kwaśnych dwa tautomery: 7H i 9H są uprotonowane w pozycji odpowiednio N3 i N1. N(6) pochodne adeniny, takie jak kinetyna, w warunkach pH obojętnego występują w postaci tautomeru 9H, natomiast w warunkach kwaśnych zachodzi przejście do tautomeru 7H. Ta transformacja jest konsekwencją zmian długości wiązania i wartości poszczególnych kątów w obrębie pierścienia adeninowego. Podstawnik w pozycji N(6) adeniny indukuje pojawienie się specyficznej aktywności biologicznej, która jest rezultatem zmian w budowie chemicznej i fizycznej związku. Z analizy krystalograficznej struktury kinetyny wiadomo, że N1 nie jest zaangażowany w tworzenie sieci wiązań wodorowych [16, 56, 58].

Analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas umożliwiły zaproponowanie wyjaśnienia mechanizmu formowania się kinetyny *in vivo* (ryc. 3). Rezultaty eksperymentów wskazują na fakt, że kinetyna jest ważnym komponentem ścieżki metabolicznej, która umożliwia komórce pozbycie się nadmiaru wolnych rodników. W ten sposób komórki neutralizują szkodliwy wpływ produktów reakcji wolnorodnikowych, takich, jak furfural i odpowiadają na stres oksydacyjny poprzez indukcję mechanizmów obronnych i reperacyjnych. Identyfikacja kinetyny, która jak dotąd występowała jedynie jako związek syntetyczny w naturalnych cząsteczkach DNA, spowodowała pojawienie się pytań dotyczących wyjaśnienia mechanizmu jej powstawania na poziomie kwasów nukleinowych. Struktura chemiczna N-6-furfuryloadeniny sugeruje, że reakcja reszty adeninowej DNA z furfuralem zachodzi tylko w drodze syntetycznej. Jednakże dotychczas nie wyjaśniono, w jaki sposób syntezowany jest ten aldehyd. Furfural jest dietetycznym mutagenem znajdującym się w wielu produktach żywnościowych, napojach (np. w kawie, białym pieczywie) i powstaje w procesie intensywnego podgrzewania cukrów. Jest on też obecny w fazie gazowej dymu tytoniowego w dość dużych ilościach (rzędu 45–110 mg na papieros). Furfural został zidentyfikowany w ludzkim osoczu krwi, moczu, homogenacie z serca i ekstraktach z kultur ludzkich osteoblastów [35, 45].



RYCINA 3. Schemat syntezy kinetyny i jej rybozydu [2]
FIGURE 3. Schema of synthesis of kinetin and its riboside [2]

Ostatnie wyniki badań wskazują, że furfural jako utleniona reszta cukrowa, jest formowany podczas uszkadzających DNA reakcji utleniania. Głównym celem w reakcji utleniania deoksyrybozy jest węgiel anomeryczny (C1), a jego hydroksylacja dostarcza 5-metyleno-2-furanonu. Furfural był również identyfikowany wśród produktów reakcji metaloporfiryn z DNA [56]. Mechanizm tej reakcji wskazuje na możliwość tworzenia się furfuralu w wyniku reakcji hydroksylacji zachodzącej przy węglu C5 deoksyrybozy w DNA. Przewidywana ilość furfuralu powstałego w wyniku hydroksylacji C5 w stosunku do 5-metyleno-2-furanonu (hydroksylacja C1) stanowi 15%. Rezultaty te wskazują na to, że furfural jest jednym z głównych produktów powstających wskutek reakcji wolnorodnikowych uszkodzeń DNA [6]. Tworzenie się furfuralu, a potem z niego kinetyny, jest też dla komórki swego rodzaju „ścieżką ratunkową" umożliwiającą usunięcie wolnych rodników z wnętrza komórki. Obecność furfuralu w połączeniu z resztami adeninowymi jako pierwszego produktu utleniania deoksyrybozy sugeruje, że degradacja reszt cukrowych jest jedną z głównych ścieżek uszkodzeń DNA, oprócz modyfikacji zasad kwasów nukleinowych. Obserwacje te są zgodne z nowym podejściem do możliwości i potencjału terapeutycznego układu immunologicznego uwzględniającym tworzenie się zasad Schiffa. Cząsteczki powstałe wskutek tworzenia się zasad Schiffa mogą działać jako donory grup karbonylowych i mogą być wyrażane na powierzchni komórek prezentujących antygen. Dlatego wchodzą one w interakcje z aminami na komórkach receptorowych T i dostarczają sygnałów stymulujących do limfocytów T, które to sygnały są niezbędne dla zapoczątkowania fosforylacji białek. Aktualnie prowadzone są badania nad wyjaśnieniem możliwej roli furfuralu, który jest również zasadą Schiffa, w układzie immunologicznym [8, 50].

Sugeruje się, że furfural tworzy połączenia z adeniną w DNA, które jest następnie odwadniane w niskim pH i powstaje kinetyna. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami reakcji furfuralu z DNA i oligonukleotydami bogatymi w AT, które powodowały destabilizację drugorzędowej struktury DNA poprzez modyfikację zasad w DNA. Obecność N-6-furfuryloadeniny w DNA wskazuje na bezpośrednie połączenie pomiędzy utlenianiem deoksyrybozy i nowym typem modyfikacji zasad purynowych. Kinetyna jest ubocznym produktem reakcji utlenienia, który powstaje w wyniku reakcji reszty adeninowej z furfuralem, który jest z kolei głównym produktem wolnorodnikowego utleniania DNA [8].

3. BIAŁKA RECEPTOROWE WIĄŻĄCE CYTOKININY

Białka wiążące cytokininy – CBP (ang. *Cytokinin-binding Protein*) zostały zidentyfikowane we frakcji cytosolowej, mikrosomalnej i błonach tylakoidów komórek roślinnych. Związanie się z nimi cytokinin inicjuje określoną odpowiedź fizjologiczną komórki. Jednym z takich białek jest CKI-1 (ang. *Cytokinin-independent 1*) o masie cząsteczkowej 125 kDa i długości łańcucha polipeptydowego – 1122 aminokwasów. Może ono pełnić rolę domniemanego receptora cytokinin [1]. Domena receptorowa,

czyli miejsce wiązania cytokinin, to domena N-końcowa w zewnątrzbłonowej pętli białka CKI1, znajdująca się pomiędzy dwiema domenami transbłonowymi. Składa się ona z 300 aminokwasów i zawiera 11 potencjalnych miejsc N-glikozylacji. Domena pełniąca rolę enzymu kinazy histydynowo-asparaginianowej (część C-końcowa) oraz domena regulatora odpowiedzi znajdują się wewnątrz komórki. Po przyłączeniu cytokininy do domeny receptorowej następuje indukcja dimeryzacji i autofosforylacji receptora. Aktywacji ulęgają kolejne białka szlaku transdukcji sygnału i w końcowym etapie zachodzi indukcja ekspresji specyficznych genów [23, 28, 42, 53]. Kolejnym białkiem jest białko CRE1 (ang. *Cytokinin Resistant 1*). Gen *CRE1* koduje nietypową hybrydową kinazę histydynową CRE1, która wykazuje podobieństwo do sekwencji aminokwasów białka CRE1. Białko CRE1 ma dwie C-końcowe domeny regulatora odpowiedzi, dwie katalityczne domeny kinazy histydynowej i dwie transbłonowe domeny flankujące zewnątrzkomórkową domenę N-końcową. Stąd też białko CRE1 może pełnić rolę receptora i generatora sygnału transdukcyjnego, który pojawia się w komórce po percepcji cytokinin [33]. Kolejne białka należą do rodziny kinaz histydynowych AHK (ang. *His Kinase in Arabidopsis*). Trzy kinazy histydynowe AHK2, AHK3 i AHK4 regulują aktywność promotorów genów ARR, które prawdopodobnie są genami wczesnej odpowiedzi na cytokininy i indukują ich transkrypcję w protoplastach mezofilu [46, 57].

Kolejnymi składnikami szlaku transdukcji sygnału cytokininowego są białka AHP – fosfotransferowe białka zawierające histydynę (ang. *His-containing Phosphotransfer Proteins of Arabidopsis*). Wchodzą one w interakcje z hipotetycznymi receptorami cytokinin (CKI1, CRE1, rodzina białek AHK) i funkcjonują jako pomost przenoszący grupę fosforanową między resztami histydynowymi obecnymi w domenie receptorowej (odbiorcy) hybrydowej kinazy a resztami asparaginowymi w domenie białka regulatora odpowiedzi [2, 24, 43, 46].

4. ROLA KINETYNY W PROCESACH OKSYDACJI I GLIKOZYLACJI METABOLITÓW

Kinetyna może oddziaływać na metabolizm komórek w dwojaki sposób. Po pierwsze może indukować syntezę enzymów reperacyjnych, które usuwają zmodyfikowane zasady z łańcucha DNA i które są zaangażowane w ochronę przeciwko wolnym rodnikom i stresowi oksydacyjnemu. Po drugie tworzy związki kompleksowe z jonami miedzi (II), które aktywują dysmutazę nadtlenkową. Kinetyna wykazuje właściwości antyoksydacyjne zarówno *in vitro,* jak i *in vivo*. Chroni DNA komórek przed oksydacyjnymi uszkodzeniami spowodowanymi gromadzeniem 8-oxo-dG powstającego wskutek reakcji Fentona. Hamuje tworzenie się 8-oxo-dG w sposób zależny od dawki, z maksimum działania w stężeniu 100 μM [44]. Kinetyna hamuje również tworzenie się pentozydyny – jednego z produktów reakcji nieenzymatycznej glikacji białek i znacznie redukuje agregację białek podczas glikacji. Dlatego jest

uważana za silny inhibitor procesów oksydacji i glikozylacji białek i kwasów nukleinowych, zwłaszcza *in vitro* [60].

Utlenione białka są ważnym czynnikiem w procesach starzenia, ponieważ są one produktami glikacji i oksydacji, które ulegają znacznej kumulacji w komórkach i tkankach podczas starzenia. Glikacja prowadzi do wiązania reszt cukrowych do wolnych grup aminokwasów lub nukleotydów, natomiast glikoksydacja polega na następujących po sobie reakcjach glikacji i oksydacji. Procesy glikoksydacji zachodzące poza komórką są procesami powolnymi, ponieważ ich szybkość zależy od stężenia glukozy, która jest najmniej reaktywnym cukrem. Natomiast procesy wewnątrzkomórkowe zachodzą dużo szybciej, ponieważ są zależne od wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia bardziej reaktywnych czynników glikacji niż glukoza, takich jak: pentozy (np. ryboza i arabinoza) oraz alfa-oksoaldehydy (np. glioksal). W efekcie tych przemian powstają zaawansowane produkty glikacji – AGEs (ang. *Advanced Glycation/Glycoxidation End Products*), takie jak pentozydyna. Stwierdzono, że kinetyna hamuje procesy powolnej i szybkiej glikacji i glikoksydacji. Hamuje ona także procesy utleniania białek oraz ich agregację oraz działa jako antyoksydant katalizujący reakcje prowadzone przez SOD i chroni przed stresem oksydacyjnym wywołanym działaniem askorbinianu. Zarówno kinetyna, jak i adenina wykazują podobne działanie antyoksydacyjne, jednak kinetyna jest bardziej efektywna. Wydaje się, że podstawnik furfurylowy w pozycji N6 jest ważny dla utrzymania ochronnych właściwości kinetyny. Paradoksalnie ten właśnie podstawnik jest odpowiedzialny za uszkodzenia spowodowane przez ROS i jednocześnie wydaje się być odpowiedzialny za antyoksydacyjne właściwości kinetyny [60].

Najpowszechniej obserwowaną modyfikacją w DNA, która jest uznawana za marker oksydatywnych uszkodzeń materiału genetycznego, jest 8-oxo-dG. Ta modyfikacja powstaje między innymi w wyniku reakcji Fentona. W tym typie reakcji generowane są zwłaszcza rodniki hydroksylowe ($^{\bullet}OH$). Stwierdzono, że kinetyna znacząco hamuje tworzenie się 8-oxo-dG. Proces ten może zachodzić na dwóch szlakach metabolicznych. Po pierwsze kinetyna może zapobiegać tworzeniu się wolnych rodników hydroksylowych, a po drugie może ona nie dopuszczać do reakcji tychże wolnych rodników hydroksylowych z DNA. Może ona wiązać żelazo, które wówczas nie może być wykorzystane w reakcji Fentona jako reduktor oraz nie może być ono wiązane przez DNA. Kinetyna może zachowywać się jak pochłaniacz wolnych rodników na dwa różne sposoby, ponieważ wolne rodniki mogą: bezpośrednio wiązać wodór z atomu węgla wiązania aminowego kinetyny lub podlegać szybkiej dysmutacji, która wynika z analogicznej do SOD aktywności kompleksu metal-kinetyna. Tworzy ona kompleksy z miedzią (II), które mają aktywność analogiczną jak SOD. W systemach biologicznych jony O_2^- odgrywają podwójną rolę w tworzeniu ROS: poprzez reakcję Fentona, gdzie są zamieniane w H_2O_2, ale też poprzez ich działanie jako reduktory dla wolnych jonów żelaza lub białek wiążących żelazo i dostarczających je dla reakcji Fentona. Dzięki aktywności kompleksów kinetyny i Cu(II) usuwany jest nadmiar jonów O_2^- i mniej jest Fe^{2+} dostępnego dla reakcji Fentona [4, 44].

5. ZNACZENIE KINETYNY W PROCESACH STARZENIA SIĘ KOMÓREK

Kinetyna jest pierwszym stabilnym ubocznym produktem powstającym wskutek uszkodzeń DNA, mającym potwierdzone właściwości cytokininowe i przeciwstarzeniowe związane z procesami oksydacyjnymi zachodzącymi w komórkach. Opóźnia ona procesy starzenia ludzkich komórek *in vitro*, a także powoduje spowolnienie rozwoju owadów i wydłuża ich cykl życiowy [51, 52]. Kinetyna działa stymulująco na aktywność niektórych genów w kulturach ludzkich fibroblastów. Zmiany, jakie można zaobserwować po jej działaniu stymulującym, to przede wszystkim wzrost wrażliwości chromatyny na hydrolizę kwasową, co związane jest ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej oraz ilości DNA w jądrze komórek fibroblastowych. Kinetyna w stężeniu 40–200 μM powoduje opóźnienie charakterystycznych zmian komórkowych i biochemicznych związanych z procesem starzenia się w kulturach komórkowych fibroblastów [31, 38, 48]. Zmiany te związane są z wpływem kinetyny na kształt komórek, ich tempo wzrostu, strukturę cytoszkieletu, syntezę makromolekuł i zawartość lipofuscyny. Gromadzenie się w komórkach lipofuscyny i ceroidów związane jest z postępującym wraz z wiekiem zaburzeniem równowagi pomiędzy procesami generacji ROS i zdolnościami antyoksydacyjnymi komórki. Przewaga procesów oksydacyjnych powoduje akumulację utlenionych białek i tłuszczów oraz produktów glikacji, takich jak pentozydyna. Działanie antyceroidowe kinetyny może wynikać z jej właściwości antyoksydacyjnych. Wszystkie zmiany zachodzą bez potencjalnych szkodliwych efektów, takich jak: zaburzenia normalnego cyklu życiowego komórki, niekontrolowanego wzrostu i proliferacji komórek oraz stymulacji kancerogenezy [17].

Przeciwstarzeniowe działanie kinetyny zostało również potwierdzone dla komórek śródbłonka skórnego. Podawanie kinetyny spowodowało wzrost ekspresji miozyny i aktyny – białek cytoszkieletu. Cytokinina aktywowała również proliferację komórek, opóźniała starzenie się komórek śródbłonkowych i stymulowała ich zdolności proliferacyjne i metaboliczne [32].

Stwierdzono również pozytywne działanie kinetyny w profilaktyce zakrzepicy tętniczej. Działa ona przeciwwolnorodnikowo i przeciwzakrzepowo. W stężeniu 50–150 μM wykazuje działanie hamujące agregacje płytek krwi, hamowanie mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia i rozpadu fosfoinozytolu w płytkach stymulowaną przez kolagen, a także hamowanie tworzenia tromboksanu A2 stymulowaną również przez kolagen i kwas arachidonowy oraz znacząco wzmaga syntezę cAMP. Szybka fosforylacja białek płytkowych, która oznacza zwiększoną aktywność kinazy białkowej C, jest stymulowana przez kolagen, a hamowana przez kinetynę. Wydaje się, że efekt działania kinetyny wynika z zahamowania aktywacji fosfolipazy C, inhibicji tworzenia tromboksanu A2 i wzrostu syntezy cAMP, co zachodzi zaraz po spadku stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywności kinazy białkowej C.

Stąd wynika, że kinetyna ma efektywne działanie przeciwzakrzepowe i jest potencjalnym środkiem terapeutycznym w zakrzepicy tętniczej [21, 54].

Kinetyna odwraca również alternatywny splicing pre-mRNA IKBKAP, który jest odpowiedzialny za tworzenie się rodzinnej dysautonomii. Choroba ta jest wywoływana przez mutację w intronie 20 IKBKAP, w efekcie której powstaje unikalny, specyficzny dla tkanki wzór pominięcia egzonu. Kinetyna znacząco zwiększa włączanie egzonu 20 zarówno z endogennego genu, jak i z minigenu IKBKAP. Jeżeli dalsze eksperymenty potwierdzą skuteczność kinetyny, to może być ona rozpatrywana jako środek zapobiegawczy przeciwko wzrostowi poziomu normalnego IKAP w rodzinnej dysautonomii i w innych zaburzeniach splicingu o podobnym mechanizmie działania [55].

Kinetyna jest pomocna w usuwaniu uszkodzeń skóry spowodowanych nadmierną ekspozycją na promienie UV. Poprawia ona strukturę skóry i powoduje, że włókna kolagenowe i elastynowe odzyskują właściwą gęstość utkania oraz zmniejsza nadmierną pigmentację skóry. Nawet bardzo niskie dawki kinetyny mogą być dermatologicznie efektywne, a skuteczność jej działania zależy w znacznym stopniu od czasu stosowania. Badania potwierdzają, że hormon ten poprawia funkcje barierowe warstwy kolczystej skóry (*stratum corneum*), zmniejsza TEWL (ang. *Transepidermal Water Loss*) i poprawia koloryt skóry, również poprzez zmniejszenie istniejących przebarwień. Wykazano, że związek ten nie powoduje powstawania alergii lub zmian skórnych nawet w przypadku wrażliwej skóry [11, 22, 29, 59, 63].

6. ROLA KINETYNY W APOPTOZIE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Sama kinetyna, jak i jej rybozyd wykazują cytotoksyczność względem komórek czerniaka. Jednak kinetyna wykazuje IC_{50} (IC_{50} oznacza taką koncentrację produktu, przy której 50% komórek jest zdolnych do tworzenia klonów) 100 razy wyższą niż rybozyd kinetyny. Dlatego też rybozyd jest bardziej wskazany do stosowania przeciwko czerniakowi. W celu zniszczenia komórki lub prewencji tworzenia się kolonii niezbędna jest obecność wiązania części furfurylowej z częścią purynową [18].

Stwierdzono, że niektóre rybonukleozydy znacząco indukują apoptozę w komórkach HL-60. Są to: adenozyna, N-6-dimetyloadenozyna, N-6-(2-izopentenylo)-adenozyna i N-6-dimetyloguanozyna. W badaniach *in vitro* nad modulowaną apoptozą spośród modyfikowanych rybonukleozydów największą aktywność wykazały: N-6-izopentenylo-2-adenozyna, N-6-dimetyloadenozyna, izopentenylo-6-adenozyna [36]. Cytokininy w formie rybozydów wykazują duży potencjał inhibicji wzrostu i indukcji apoptozy w komórkach białaczki szpikowej (komórkach HL-60). Mogą one działać bezpośrednio jako antyoksydanty lub pośrednio jako regulatory aktywności antyoksydantów. Te ich cechy pozwalają zrozumieć, dlaczego cytokininy mają aktywność indukującą różnicowanie komórek bez indukcji apoptozy. Cytokininy w postaci nukleozydów mają taką samą aktywność indukującą różnicowanie komórek,

jak wolne cytokininy w komórkach białaczki szpikowej. Cytokininy w formie rybozydów indukują powstawanie zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów, podczas gdy wolne cytokininy chronią przed tymi zakłóceniami oraz przed apoptozą komórki nowotworowe. Rybozydy cytokininowe znacząco redukują zawartość wewnątrzkomórkowego ATP i zakłócają potencjał błony mitochondrialnej oraz akumulację ROS, podczas gdy wolne cytokininy nie wykazują takiej aktywności. Komórki inkubowane z cytokininami w formie rybozydów w obecności związku pochłaniającego wolne rodniki tlenowe, antyoksydanta oraz inhibitora kaspazy wykazywały zahamowanie apoptozy i wzmożenie różnicowania komórek. Wyniki badań Honma Y. i Ishii Y. z *Saitama Cancer Center Research Institute* w Japonii wskazują na fakt, że cytokininy indukują różnicowanie granulocytarne komórek HL-60, natomiast rybozydy cytokinin indukują apoptozę w komórkach nowotworowych. Wyniki badań pochodzące z wyżej wymienionego ośrodka wskazują na korelację między stymulującym działaniem cytokinin na różnicowanie komórek w roślinach, a mechanizmem ich działania w procesie różnicowania się komórek białaczki szpikowej [20, 25].

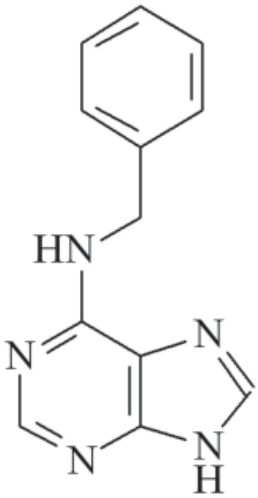
Kinetyna w postaci rybozydów stymuluje w komórkach nowotworowych proces apoptozy. Wpływa ona także na regulację *Bad* i *Bak* oraz *Bcl-2* w komórkach Hela. Rodzina białek Bcl-2 to grupa bardzo ważnych w apoptozie czynników. Interakcja między czynnikami: antyapoptotycznym i proapoptotycznym stwarza podstawy modulowania programowanej śmierci komórki. Dysregulacja białek Bcl-2 prowadzi do obumarcia komórek lub nadmiernej ich proliferacji, takiej jaka charakteryzuje choroby neurodegeneracyjne lub nowotwory. Mimo że mutacje wśród białek Bcl-2 są rzadkie w nowotworach, to jednak stwierdzono w komórkach rakowych antyapoptotyczne cząsteczki, takie jak Bcl-2 lub Bcl-XL. Rybozydy kinetyny powodują mitochondrialne dysfunkcje poprzez stymulację proapoptotycznych białek Bad i Bak i inhibicję antyapoptotycznych białek Bcl-2 i BclXL. To z kolei powoduje uwolnienie cytochromu c i aktywację kaspazy-3, co jest bezpośrednią przyczyną śmierci komórek rakowych. Dlatego też rybozydy kinetyny są rozważane jako potencjalny lek antynowotworowy, zwłaszcza przeciwko czerniakowi złośliwemu [10]. Wykazano również, że inne analogi chemiczne zasady purynowej z częścią rybozydową są efektywne w inhibicji zarówno wczesnych, jak i późnych faz procesu angiogenezy [47].

7. WPŁYW N-6-BENZYLOADENINY NA PODZIAŁY KOMÓREK

N-6-benzyloadenina (BAP) i jej pochodne są aktywnymi i łatwo dostępnymi substancjami stymulującymi wzrost i metabolizm roślin (ryc. 4). Zaliczane są do grupy hormonów roślinnych – cytokinin. Przez długi czas były uważane za związki wyłącznie syntetyczne, jednakże zostały one wykryte w tkankach roślinnych. Związki należące do tej grupy regulują wiele procesów biochemicznych na poziomie komórkowym, ale największy wpływ mają na podziały komórek. W cyklu komórkowym są zaangażowane w regulację przejść z fazy G1/S i G2/M. Zwiększają ekspresję genu *CYCD3*, który koduje cykliny typu D. W komórkach zwierzęcych aktywność cyklin

D jest regulowana przez wiele czynników wzrostowych, które odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, zwłaszcza fazy G1 [15].

Bardzo ważną właściwością cytokinin pochodnych BAP jest ich zdolność do hamowania niektórych ludzkich kinaz białkowych w sposób niespecyficzny, włącznie z CDKs (ang. *Cyklin Dependent Kinases*). Kinazy CDK są regulatorami różnych faz cyklu komórkowego komórek eukariotycznych. Regulacja cyklu komórkowego i wzrost nowotworów są ze sobą ściśle związane. Niewłaściwa ekspresja lub mutacje pojawiające się w genach kodujących kinazy cyklino-zależne (CDKs), cykliny bądź inhibitory kinaz cyklino-zależnych są odnajdywane w wielu typach nowotworów. Dodatkowy podstawnik w miejscu C2 lub N9 cząsteczki BAP prowadzi do pojawienia się silnego i specyficznego hamowania różnych ważnych kinaz białkowych, takich jak: CDK1/cyklina B, CDK/cyklina A, CDK2/cyklina E, mózgowa CDK5/p35 i kinaza ERK1/MAP. Te czynniki mają dużą zdolność do zatrzymania pewnych faz cyklu komórkowego i indukcji apoptozy. Kinazy CDK1 odgrywają rolę w fazie mitozy, natomiast pozostałe kinazy CDK we wczesnych fazach podziału komórki (interfazie). Kontrola tych procesów jest ważna zwłaszcza w komórkach nowotworowych, w których regulatory cyklu komórkowego podlegają często różnorakim mutacjom. Zaburzenia procesu apoptozy prowadzą do różnych schorzeń, w tym nowotworowych. Dlatego też aktywność CDKs i ich potencjalna inhibicja jest nowym celem dla opracowania nowych leków antynowotworowych [14, 15, 61].



RYCINA 4. N-6-benzyloadenina – wzór strukturalny
FIGURE 4. N-6-benzyloadenine – chemical structure

Analogi BAP wykazują silną aktywność inhibicyjną w stosunku do CDK oraz podobny efekt hamowania na procesy proliferacji komórek. Grupa benzyloaminowa w pozycji C6 pierścienia purynowego jest uważana za odpowiedzialną w specyficznej inhibicji CDK. Efekt ten jest jeszcze dodatkowo wzmocniony poprzez dodanie jednej grupy hydroksylowej do podstawnika benzyloaminowego w pozycji C6. Wszystkie analogi BAP z podstawnikiem 6-hydroksybenzyloaminowym wykazują silne hamowanie CDK1/CDK2 oraz wzrostu komórek. Wykazano również znaczną korelację między tymi procesami w odniesieniu do komórek szpikowych i limfoblastycznych, co wskazuje na fakt, że efekt antyproliferacyjny wynika z inhibicji CDK [62].

8. MOLEKULARNE MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA BAP I JEGO POCHODNYCH NA PROCES APOPTOZY KOMÓREK

Antyproliferacyjna aktywność inhibitorów CDK jest związana z apoptozą. W liniach komórek nowotworowych apoptoza stymulowana lekami zależy od aktywacji

kaspaz – głównych efektorów apoptozy. Aktywacja kaspaz zachodzi na dwóch ścieżkach metabolicznych: po pierwsze receptory śmierci komórek, takie jak *Fas*, mogą stymulować kaspazę-8, która z kolei aktywuje kaspazę-3; po drugie mitochondria mogą uwalniać czynniki apoptotyczne, takie jak: cytochrom C i APAF-1, co prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej i aktywacji kaspazy-9, która również aktywuje kaspazę-3. Indukcja apoptozy przez inhibitory CDK zachodzi poprzez aktywację mechanizmu zależnego od receptorów śmierci komórkowej, a blokowanie funkcji receptorów *Fas* nie wpływa na indukcję apoptozy przez inhibitory CDK. Apoptoza, indukowana przez analogi BAP mające aktywność inhibitorów CDK, jest bardzo szybka i zachodzi poprzez aktywację ścieżki mitochondrialnej, następnie pojawienie się fosfatydyloinozytolu, aktywację kaspaz i kondesację DNA. Sposób, w jaki analogi chemiczne cytokinin aktywują ścieżkę mitochondrialną, dotychczas nie jest wyjaśniony. Uszkodzenia mitochondrium są końcowym etapem wśród mnogości różnych sygnałów, które pojawiają się podczas apoptozy. Ścieżki, które prowadzą do uszkodzeń mitochondrialnych, są złożone i jeszcze słabo poznane [14, 19, 61].

Według Mlejnek P. i Kuglik P. (2000 r.) w komórkach HL-60 już mikromolarne stężenia N-6-benzyloadenozyny (N-6-rybozydu N-6-benzyloaminopuryny – BAPR) są wystarczające dla zapoczątkowania w nich apoptozy [40]. Śmierć komórek indukowana przez BAPR jest szybka i zachodzi w sposób synchroniczny. Badania struktury chromatyny i integralności DNA w trakcie tego procesu wykazały, że przemieszczanie się chromatyny w kierunkach obrzeża jądra komórkowego jest jednym z jego najważniejszych etapów. Taka rearanżacja chromatyny jest procesem nieodwracalnym i zachodzi bez wyraźnej degradacji DNA. Rozpad DNA należy już do raczej późnych faz śmierci komórkowej i jest obserwowany w komórkach wykazujących typowe zmiany apoptotyczne, takie jak obecność ciałek apoptotycznych. Na podstawie czasowych zmian w poziomie ATP w umierających komórkach wysnuto wniosek, że ATP jest niezbędny do przemieszczania się chromatyny w kierunku obrzeży jądra, ale nie dla następującej później kondensacji chromatyny prowadzącej do formowania się ciałek apoptotycznych. Fragmentacja DNA wydaje się również niezależna od ATP. Wyżej opisane zmiany są charakterystyczne dla apoptozy zachodzącej bez udziału BAPR, jednakże BAPR również indukuje wszystkie te zmiany apoptotyczne zachodzące w komórkach HL-60. Natomiast adenozyna, której BAPR jest pochodną, znacząco je redukuje. Ponieważ transport egzogennej adenozyny do komórek jest niezbędny, aby pojawił się jej efekt protekcyjny, to adenozyna okazała się kompetycyjnym inhibitorem kinazy adenozynowej i dlatego wykazuje ona efekt redukcji wewnątrzkomórkowej fosforylacji BAPR. Wykazano również, że potencjalne inhibitory kinazy adenozynowej całkowicie zapobiegają apoptozie indukowanej przez BAPR. Rezultaty te wskazują, że cytotoksyczny efekt działania BAPR jest związany z jego aktywacją poprzez fosforylację wewnątrz komórki bardziej niż z jego interakcją z pozakomórkowymi receptorami adenozynowymi [30, 36, 39, 40].

Bardzo ważna jest również rola kaspaz w komórkach HL-60, w których wyindukowano apoptozę przy pomocy BAPR. Apoptozie stymulowanej przez BAPR towarzyszy znaczący wzrost aktywności kaspazy-3 i -9. W komórkach HL-60

traktowanych BAPR zaobserwowano objawy apoptozy w obrębie jądra komórkowego, które pojawiają się wskutek wystąpienia dwóch procesów charakteryzujących się różną wrażliwością na inhibicję kaspaz. Pierwszy to proces kondesacji chromatyny, który jest tylko częściowo wrażliwy na inhibicję kaspaz i dlatego tylko częściowo i niebezpośrednio zależny od kaspaz. Jest to obserwacja zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, że wczesne etapy apoptozy, które poprzedzają aktywację kaspaz, takie jak translokacja czynnika indukującego apoptozę – AIF (ang. *Apoptosis Inducing Factor*) z mitochondrium do jądra jest odpowiedzialna za kondensację chromatyny. Drugi proces to tworzenie ciałek apoptotycznych i rozpad DNA, który jest wrażliwy na inhibicję kaspaz i całkowicie od niej zależny. Kondensacja chromatyny jest zależna nie tylko od aktywności kaspaz, ale też od dostępności ATP. Wynika to z faktu, że BAPR indukuje zmniejszenie się poziomu wewnątrzkomórkowego ATP, a spadek ilości ATP jest proporcjonalny do stężenia BAPR. Powiązanie między apoptozą a nekrozą jest kontrolowane zarówno przez aktywność kaspaz, jak i przez poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Wyniki badań wskazują również na fakt, że podczas apoptozy indukowanej przez BAPR w komórkach HL-60 obserwuje się wzrost aktywności innych kaspaz, np. kaspazy-2 i -6. Dlatego też uważa się, że nie tylko znaczny wzrost aktywności określonych kaspaz, ale również dostępność wewnątrzkomórkowego ATP ma istotne znaczenie dla rozpoczęcia procesu programowanej śmierci komórki [41].

Badano również indukcję apoptozy przez N6-podstawione pochodne adeniny i adenozyny w komórkach HL-60. Okazało się, że zarówno pochodne adeniny, jak i adenozyny ulegają w obrębie komórki fosforylacji do poziomu monofosforanów. Podczas gdy pochodne adenozyny były fosforylowane przez kinazę adenozyny, w efekcie tworzyły się duże ilości analogicznych mononukleotydów. Przede wszystkim pochodne adeniny były przetwarzane w analogiczne mononukleotydy poprzez transferazę fosforybozylową, która dostarcza 50–100 razy mniejszych ilości mononukleotydów, aniżeli działanie kinazy adenozynowej. Dlatego też N6-pochodne adeniny są relatywnie niewystarczającym induktorem apoptozy. Natomiast inhibitory kinazy adenozynowej, które zatrzymywały formowanie się monofosforanów z N6-pochodnych adenozyny całkowicie zapobiegały wkroczeniu komórki na drogę apoptozy. Wskazuje to, że pro-apoptotyczny efekt N6-pochodnych adenozyny jest związany z ich wewnątrzkomórkową przemianą do analogicznych mononukleotydów, które stymulują apoptozę, gdy ich zawartość w komórce przekroczy określony metabolicznie poziom. Wewnątrzkomórkowa akumulacja mononukleotydów pochodzących z przemian N6-pochodnych adenozyny prowadzi do szybkiego wzrostu poziomu ATP i w konsekwencji – indukcji apoptozy. Jednak szczegółowy mechanizm tego procesu na poziomie molekularnym jest nie do końca poznany [39].

BAP okazała się również bardzo efektywnym czynnikiem stymulującym różnicowanie się komórek ludzkiej białaczki szpikowej. Przemiany cytokinin do ich nukleotydów są blisko związane ze stymulowaną cytokininami inhibicją różnicowania i wzrostu komórek. Wyniki badań wskazują na fakt, że nukleotydy cytokininowe nie są bezpośrednio włączane w DNA lub RNA, ale efektywnie indukują fosforylację

kinaz MAP – MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Aktywacja kinaz MAPK jest niezbędna do różnicowania się komórek wywołanego obecnością cytokinin, co wynika z faktu, że inhibitor kinazy MAPK tłumi różnicowanie indukowane przez cytokininy. Rezultaty te sugerują, że same nukleotydy cytokininowe odgrywają ważną rolę w indukcji różnicowania komórek nowotworowych [26].

Natomiast 9-benzyloadenina, pochodna adeniny podstawiona w pozycji N9, wykazuje znaczną zdolność do inhibicji fosfodiesteraz (PDE), szczególnie w stosunku do fosfodiesterazy-4 (PDE-4). PDE są szeroko rozpowszechnione w tkankach ssaków, gdzie odgrywają główną rolę w transdukcji sygnałów komórkowych, poprzez hydrolizę cAMP i cGMP. Ich różnorodność pozwala na specyficzną dystrybucję na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Dlatego też PDE mogą selektywnie regulować różne biochemiczne funkcje komórkowe. Ważna rola, jaką odgrywają PDE w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, stwarza możliwości wykorzystania ich jako terapeutycznych czynników w procesach zapalnych. Superrodzina PDE składa się z 11 rodzin (PDE1 do PDE11).

PDE4 (cAMP-PDE) wcześniej nazywana ROI-PDE lub PDE-IV jest głównie obecna w mózgu, komórkach stanu zapalnego, mięśniu sercowym i naczyniach krwionośnych oraz mięśniach gładkich. Jest to największa rodzina spośród wszystkich PDE. Jest kodowana przez cztery różne geny (PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D), a w wyniku alternatywnego splicingu mRNA powstają różne izozymy PDE4 (co najmniej 35 różnych białek). Rodzina PDE4 hydrolizuje tylko cAMP i zawiera unikalny region o sekwencji aminokwasowej nazywanej UCR1 i UCR2 (ang. *Upstream Conserved Region 1 and 2*). Są one ulokowane pomiędzy końcem aminoterminalnym i regionem katalitycznym w enzymach PDE4. Aktywność PDE4 jest regulowana przez fosforylację, asocjację z białkami, czynniki endogenne i proteolizę. Przedłużona akumulacja cAMP indukuje długoterminową regulację PDE4, a zwłaszcza jej aktywację [34]. Pochodne benzyloadeniny okazały się selektywnymi inhibitorami PDE4. Inhibicja PDE4 wiąże się z właściwościami przeciwzapalnymi pochodnych BAP. Hamują one również w znacznym stopniu syntezę czynnika TNF-α (ang. *Tumor Necrosis Factor*). Jest on kluczowym wśród cytokin czynnikiem wpływającym na rozwój chorób o charakterze zapalnym. Wysoki poziom TNF-α jest obserwowany w różnych stanach patologicznych, takich jak: astma, reumatoidalne zapalenie stawów i stany zapalne jelit. Inhibitory PDE4 należą do czynników anty-TNF-α, hamujących jego syntezę, które są stosowane w wielu chorobach z przebiegiem stanu zapalnego, takich jak: astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, atopia skórna, reumatoidalne zapalenie stawów i różne choroby neurologiczne [9, 34, 49].

Ponadto w kulturach fibroblastów zaobserwowano, że pochodne N-6-benzyloadeniny indukują elongację komórek, osłabienie ich ruchów i gwałtowny wzrost adhezji ich do podłoża. Podobny wpływ na kształt, intensywność ruchu i adhezję komórek był obserwowany w przypadku stymulacji hodowli inhibitorami PDE, które zwiększały wewnątrzkomórkowy poziom cAMP [27].

9. PODSUMOWANIE

Cytokininy jako pochodne adeniny z podstawnikami alifatycznymi, aromatycznymi, bądź heterocyklicznymi przy azocie grupy aminowej węgla C-6 szkieletu purynowego odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego u roślin i zwierząt, zwłaszcza podczas przejścia z fazy G1 do S i G2 do M. Badania dotyczące wpływu kinetyny na ludzkie i zwierzęce komórki normalne i patologiczne – nowotworowe wykonywane *in vitro*, a także *in vivo* wykazały, że mają one zdolność opóźniania procesów starzenia się, a także wykazują w licznych przypadkach patologii działanie prewencyjne bądź lecznicze. Ponadto szczególną właściwością pochodnych BA jest zdolność do niespecyficznego hamowania niektórych kinaz białkowych, zwłaszcza cyklinozależnych (CDK), które są regulatorami cyklu komórkowego eukariontów w różnych jego fazach przebiegu. Ma to istotne znaczenie w praktycznym zastosowaniu w niedalekiej przyszłości w terapii nowotworów i innych schorzeń, a także w opóźnianiu procesów starzenia się organizmu, zwłaszcza niektórych tkanek i narządów, np. skóry. Właściwość indukowania apoptozy komórkowej przez niektóre analogi BA mające aktywność inhibitorów CDK jest uwarunkowana między innymi szybką aktywacją kaspaz, uszkodzeniem mitochondriów i nadmierną kondensacją chromatyny. Dotychczasowe doświadczenia wskazują na duże możliwości wykorzystania pochodnych bądź analogów chemicznych typowych cytokinin roślinnych, szczególnie BA w terapii chorób nowotworowych innych schorzeń, zwłaszcza z silnie rozwiniętym procesem zapalnym. Jednakże niezbędne są dalsze badania genetyczne, molekularne i immunologiczne, które by w pełni potwierdziły efekt pozytywnego ich działania na organizm ludzki, wykluczając jednocześnie możliwość ich działania toksycznego.

LITERATURA

[1] ANANTHARAMAN V, ARAVIND L. The chase domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 579–582.

[2] BARCISZEWSKI J, MASSINO F, CLARK BF. Kinetin – a multiactive molecule. *Int J Biol Macromol* 2007; **40**: 182–192.

[3] BARCISZEWSKI J, MIELCAREK M, STOBIECKI M, SIBOSKA G, CLARK BF. Identification of 6-furfuryladenine (kinetin) in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 69–73.

[4] BARCISZEWSKI J, RATTAN SI, SIBOSKA GE, OTZEN DE, CLARK BF. Reduction in the amount of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of SV40-transformed human fibroblasts as compared with normal cells in culture. *FEBS Lett* 1993; **318**: 186–188.

[5] BARCISZEWSKI J, RATTAN SIS, SIBOSKA G, CLARK BFC. Kinetin – 45 years on. *Plant Science* 1999; **148**: 37–45.

[6] BARCISZEWSKI J, SIBOSKA GE, PEDERSEN BO, CLARK BF, RATTAN SI. A mechanism for the *in vivo* formation of N-6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS Lett* 1997; **414**: 457–460.

[7] BARCISZEWSKI J, SIBOSKA GE, PEDERSEN BO, CLARK BF, RATTAN SI. Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett* 1996; **393**: 197–200.

[8] BARCISZEWSKI J, SIBOSKA GE, PEDERSEN BO, CLARK BF, RATTAN SI. Furfural, a precursor of the cytokinin hormone kinetin, and base propenals are formed by hydroxyl radical damage of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 317–319.
[9] BOICHOT E, WALLACE JL, GERMAIN N, CORBEL M, LUGNIER C, LAGENTE V, BOURGUIGNON JJ. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**: 647–653.
[10] CHOI BH, KIM W, WANG QC, KIM DC, TAN SN, YONG JW, KIM KT, YOON HS. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Lett* 2008; **261**: 37–345.
[11] CZERPAK R, JABŁOŃSKA A. Zastosowanie cytokinin i izoflawonoidów w kosmetyce i terapii (I). *Med Estet i Przeciwstarz* 2005; **4**: 73–79.
[12] CZERPAK R, KROTKE A, MICAL A. Comparison of stimulatory effect of auxins and cytokinins on protein, saccharides and chlorophyll content in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Pol Arch Hydrobiol* 1999; **46**: 71–82.
[13] CZERPAK R, PIOTROWSKA A. Cytokininy, ich struktura, metabolizm i aktywność biologiczna. *Kosmos* 2003; **52**: 203–215.
[14] DOLEZAL K, POPA I, HAUSEROVÁ E, SPICHAL L, CHAKRABARTY K, NOVÁK O, KRYSTOF V, VOLLER J, HOLUB J, STRNAD M. Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N-6-benzyladenosines. *Bioorg Med Chem* 2007; **15**: 3737–3747.
[15] DOLEZAL K, POPA I, KRYSTOF V, SPICHAL L, FOJTIKOVÁ M, HOLUB J, LENOBEL R, SCHMÜLLING T, SSTRNAD M. Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med Chem* 2006; **14**: 875–884.
[16] GE L, YONG JWH, TAN SN, YANG XH, ONG ES. Analysis of positional isomers of hydroxylated aromatic cytokinins by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 2005; **26**: 1768–1777.
[17] GLASER D A. Anti-aging products and cosmeceuticals. *Facial Plast Surg Clin N Am* 2004; **12**: 363–372.
[18] GRIFFAUT B, BOS R, MAURIZIS JC, MADELMONT JC, LEDOIGT G. Cytotoxic effects of kinetin riboside on mouse, human and plant tumour cells. *Int J Biol Macromol* 2004; **34**: 271–275.
[19] GUILLARD J, DECROP M, GALLAY N, ESPANEL C, BOISSIER E, HERAULT O, VIAUD-MASSUARD MC. Synthesis and biological evaluation of 7-azaindole derivatives, synthetic cytokinin analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; **17**: 1934–1937.
[20] HONMA Y, ISHII Y. Differentiation of human myeloid leukemia cells by plant redifferentiation-inducing hormones. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 1729–1735.
[21] HSIAO G, SHEN MY, LIN KH, CHOU CY, TZU NH, LIN CH, CHOU DS, CHEN TF, SHEU JR. Inhibitory activity of kinetin on free radical formation of activated platelets *in vitro* and on thrombus formation *in vivo. Eur J Pharmacol* 2003; **465**: 281–287.
[22] HUANG CK, MILLER TA. The truth about over-the-counter topical anti-aging products: a comprehensive review. *Aesth Surg J* 2007: 402–412.
[23] HUTCHINSON C, KIEBER JJ. Cytokinin signaling in *Arabidopsis. Plant Cell* 2002; (suppl.): 47–59.
[24] HWANG I, CHEN HC, SHEEN J. Two component signal transduction pathways in *Arabidopsis. Plant Physiol* 2002; **129**: 500–515.
[25] ISHII Y, HORI Y, SAKAI S, HONMA Y. Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ* 2002; **13**: 19–26.
[26] ISHII Y, SAKAI S, HONMA Y. Cytokinin-induced differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells is associated with the formation of nucleotides, but not with incorporation into DNA or RNA. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1643**: 11–24.
[27] JOHNSON GS, D'ARMIENTO M, CARCHMAN RA. N6-substituted adenines induce cell elongation irrespective of the intracellular cyclic AMP levels. *Exp Cell Res* 1974; **85**: 47–56.
[28] KAMINEK M, TRCKOVA M, FOX JE, GAUDINOVA A. Comparison of cytokinin binding proteins from wheat and oat grains. *Physiol Plant* 2003; **107**: 453–458.
[29] KIMURA T, DOI K. Depigmentation and rejuvenation effects of kinetin on the aged skin of hairless descendants of Mexican hairless dogs. *Rejuvenation Res* 2004; **7**: 32–39.
[30] KOHNO Y, SEI Y, KOSHIBA M, KIM HO, JACOBSON KA. Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **219**: 904–910.

[31] KOWALSKA E. Influence of kinetin (6-furfurylo-amino-purine) on human fibroblasts in the cell culture. *Folia Morphol (Warsz)* 1992; **51**: 109–118.
[32] LEE JH, CHUNG KY, BANG D, LEE KH. Searching for aging-related proteins in human dermal microvascular endothelial cells treated with anti-aging agents. *Proteomics* 2006; **6**: 1351–1361.
[33] LOHRMANN J, HARTER K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plan Physiol* 2002; **128**: 363–369.
[34] LUGNIER C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 2006; **109**: 366–398.
[35] LUO XP, YAZDANPANAH M, BHOOI N, LEHOTAY DC. Determination of aldehydes and other lipid peroxidation products in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995; **228**: 294–298.
[36] MEISEL H, GÜNTHER S, MARTIN D, SCHLIMME E. Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems. *FEBS Lett* 1998; **433**: 265–268.
[37] MILLER CO, SKOOG F, OKUMURA FS, von SALTZA MH, STRONG FM. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substrate promoting cell division. *J Amer Chem Soc* 1956; **78**: 1375–1380.
[38] MILLER CO, SKOOG F, von SALTZA MH, STRONG FM. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Amer Chem Soc* 1955; **77**: 1392.
[39] MLEJNEK P, DOLEZEL P. Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicol In Vitro* 2005; **19**: 985–990.
[40] MLEJNEK P, KUGLIK P. Induction of apoptosis in HL-60 cells by N(6)-benzyladenosine. *J Cell Biochem* 2000; **77**: 6–17.
[41] MLEJNEK P. Caspase inhibition and N-6-benzyladenosine-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Cell Biochem* 2001; **83**: 678–689.
[42] MOK MC, MARTIN RC, MOK DWS. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2000; **36**: 102–107.
[43] OKA A, SAKAI H, IWAKOSHI S. His-Asp phosphore lay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana. Genes Genet Syst* 2002; **77**: 383–391.
[44] OLSEN A, SIBOSKA GE, CLARK BF, RATTAN SI. N(6)-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**: 499–502.
[45] PARKASH MK, CALDWELL J. Metabolism and excretion of [14C] furfural in the rat and mouse. *Food Chem Toxicol* 1994; **32**: 887–895.
[46] PIOTROWSKA A, CZERPAK R. Molekularne mechanizmy działania cytokinin. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 93–115.
[47] PRESTA M, RUSNATI M, BELLERI M, MORBIDELLI L, ZICHE M, RIBATTI D. Purine analogue 6-methylmercaptopurine riboside inhibits early and late phases of the angiogenesis process. *Cancer Res* 1999; **59**: 2417–2424.
[48] RATTAN SI, CLARK BF. Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **201**: 665–672.
[49] REIMUND JM, RABOISSON P, PINNA G, LUGNIER C, BOURGUIGNON JJ, MULLER CD. Anti-TNF-alpha properties of new 9-benzyladenine derivatives with selective phosphodiesterase-4-inhibiting properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**: 427–434.
[50] RHODES J, CHEN H, HALL SR, BEESLEY JE, JENKINS DC, COLLINS P, ZHENG B. Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 1995; **377**: 71–75.
[51] SHARMA SP, KAUR J, RATTAN SI. Increased longevity of kinetin-fed *Zaprionus* fruitflies is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity. *Biochem Mol Biol Int* 1997; **41**: 869–875.
[52] SHARMA SP, KAUR P, RATTAN SI. Plant growth hormone kinetin delays ageing, prolongs the lifespan and slows down development of the fruitfly *Zaprionus paravittiger. Biochem Biophys Res Commun* 1995; **216**: 1067–1071.
[53] SHEEN J. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science* 2002; **296**: 1650–1652.
[54] SHEU JR, HSIAO G, SHEN MY, CHOU CY, LIN CH, CHEN TF, CHOU DS. Inhibitory mechanisms of kinetin, a plant growth-promoting hormone, in platelet aggregation. *Platelets* 2003; **14**: 189–196.

[55] SLAUGENHAUPT SA, MULL J, LEYNE M, CUAJUNGCO MP, GILL SP, HIMS MM, QUINTERO F, AXELROD FB, GUSELLA JF. Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 429–436.
[56] STANLEY N, MUTHIAH PT, GEIB SJ. N-6-furfuryladenine (kinetin) hydrochloride. *Acta Cryst* 2003; **59**: 27–29.
[57] SUZUKI T, MIWA K, ISHIKAWA K, YAMADA H, AIBA H, MIZUNO T. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 107–113.
[58] ŚLOSAREK G, KOZAK M, GIERSZEWSKI J, PIETRASZKO A. Structure of N-6-furfurylaminopurine (kinetin) dihydrogenphosphate. *Acta Cryst* 2006; **62**: 102–108.
[59] TOURNAS JA, LIN FH, BURCH JA, SELIM MA, MONTEIRO-RIVIERE NA, ZIELIŃSKI JE, PINNELL SR. Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamins C and E with ferulic acid. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 1185–1187.
[60] VERBEKE P, SIBOSKA GE, CLARK BF, RATTAN SI. Kinetin inhibits protein oxidation and glycoxidation *in vitro. Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**: 1265–1270.
[61] VERMEULEN K, STRNAD M, HAVLICEK L, VAN ONCKELEN H, LENJOU M, NIJS G, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. Plant cytokinin analogues with inhibitory activity on cyclin-dependent kinases exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis initiated by the mitochondrial pathway: determination by a multiparametric flow cytometric analysis. *Exp Hematol* 2002; **30**: 1107–1114.
[62] VERMEULEN K, STRNAD M, KRYSTOF V, HAVLICEK L, VAN DER AA A, LENJOU M, NIJS G, RODRIGUS I, STOCKMAN B, van ONCKELEN H, Van BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia* 2002; **16**: 299–305.
[63] WU JJ, WEINSTEIN GD, KRICORIAN GJ, KORNEILI T, McCULLOUGH JL. Topical kinetin 0.1% lotion for improving the signs and symptoms of rosacea. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**: 693–695.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano:24.11. 2008 r.
Przyjęto: 25.02. 2009 r.
Agata Jabłońska-Trypuć
Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku
ul. Krakowska 9, 15-875 Białystok
e-mail: a.jablonska-trypuc@wskosm.pl