

Wpływ kinetyny i N-6-benzyloadeniny na migrację komórek oraz biosyntezę kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej

Kinetin and N-6-benzyladenine influence on cell migration and collagen biosynthesis in human skin fibroblasts

*Agata Jabłońska-Trypuć, **Walentyn Pankiewicz, **Romuald Czerpak

* Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok, Polska, e-mail: a.jablonska@pb.edu.pl, tel: +48 85 746 90 00; ** Wyższa Szkoła Medyczna w Białymstoku, ul. Krakowska 9, 15-875 Białystok, Polska

Słowa kluczowe: kolagen, kinetyna, N-6-benzyloadenina, cytokininy, fibroblasty, skóra
Keywords: collagen, kinetin, N-6-benzyladenine, cytokinins, fibroblasts, skin

Streszczenie

Kinetyna i N-6-benzyloadenina należą do grupy hormonów roślinnych – cytokinin. W poprzednich pracach wykazaliśmy ich pozytywny wpływ na podstawowe parametry stresu oksydacyjnego, dlatego podjęliśmy próbę zbadania efektu, jaki wywierają one na migrację komórek i syntezę kolagenu. Działanie fitohormonów było badane w dwóch stężeniach: kinetyny – w stężeniach 10^{-5} i 10^{-6} , a N-6-benzyloadeniny w stężeniach 10^{-6} i 10^{-7} M. Komórki stanowiące kontrolę były inkubowane bez badanych związków. Migracja komórek została oszacowana przy wykorzystaniu testu Wound Healing Assay. Stężenie białka całkowitego oznaczono przy pomocy metody Lowry'ego, a zawartość kolagenu w medium i komórkach, stosując metodę Sirius Red. Wyniki wskazują na stymulujący wpływ badanych związków na migrację komórek oraz na biosyntezę kolagenu, jak również na całkowitą zawartość białka. Wykazany przez nas pozytywny wpływ kinetyny i N-6-benzyloadeniny na metabolizm fibroblastów pozwala na wskazanie ich jako związków o właściwościach potencjalnie terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście chorób skóry.

Summary

N-6-benzyladenine and kinetin belong to a group of plant hormones called cytokinins. Our previous work showed their positive influence on oxidative stress parameters tested in fibroblasts, thus we decided to examine their effect on cell migration and collagen synthesis. The activity of phytohormones was tested in a final concentration range of 10^{-5} to

10^{-6} M for kinetin and 10^{-6} to 10^{-7} M for N6-benzyladenine. The control cells were incubated without the test compound. Fibroblasts migration was assayed by using Wound Healing Assay. The concentration of proteins was determined spectrophotometrically as per Lowry et al (1951). Collagen content in cells and medium was determined spectrophotometrically by observation that Sirius red in saturated picric acid selectively binds to fibrillar collagens (types I to V). The results show stimulatory effect of tested compounds on cells migration and collagen biosynthesis, as well as total protein content. Kinetin and N-6-benzyladenine effectiveness demonstrated in this study in relation to the skin cells may indicate their potential therapeutic relevance, especially regarding skin diseases.

Wstęp

Cytokininy są jedną z głównych grup hormonów roślinnych. Molekularny mechanizm ich działania w tkankach roślinnych został dość szczegółowo opisany, jednak niewiele jest danych literaturowych dokumentujących ich wpływ na metabolizm komórek zwierzęcych i ludzkich [1]. W naszych poprzednich pracach wykazaliśmy pozytywny wpływ wybranych związków z grupy cytokinin – kinetyny (K) i N-6-benzyladeniny (BA) na podstawowe parametry stresu oksydacyjnego [2]. Do grupy cytokinin należą również związki pochodne kwasów tłuszczowych. Przykładem takiego związku jest kwas traumatynowy będący pochodną traumatyny – hormonu przyrannego, stymulującego zabliznianie się ran w roślinach. Nasze ostatnie badania potwierdziły również pozytywny wpływ tego związku na biosyntezę kolagenu i redukcję poziomu stresu oksydacyjnego w fibroblastach ludzkich [3]. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, zdecydowaliśmy się na zbadanie wpływu K i BA na migrację komórek oraz syntezę kolagenu – podstawowego białka budulcowego skóry ludzkiej. Hodowla *in vitro* fibroblastów skóry ludzkiej jest doskonałym modelem badawczym pozwalającym na przeanalizowanie wpływu biologicznie aktywnych substancji na podstawowe parametry biochemiczne i zmiany morfologiczne zachodzące w skórze. Ponieważ wybrane cytokininy nie były dotąd badane pod względem ich potencjalnego działania terapeutycznego na skórę ludzką, celem naszych badań było oszacowanie ich wpływu na zmiany morfologiczne komórek, ich migrację i wybrane parametry biochemiczne, takie jak zawartość białka całkowitego oraz kolagenu. Kolagen jest podstawowym białkowym składnikiem skóry [4]. Linie komórkowe na których przeprowadzono eksperyment pochodziły od dawców w wieku od 30 do 40 lat, dlatego też możemy sądzić, że korzystny efekt wywierany przez badane fitohormony jest związany nie tylko z ich potencjalnym działaniem

terapeutycznym, ale również spowalniającym procesy starzenia się skóry poprzez wspieranie najważniejszego jej komponentu – kolagenu. Zostało opisanych wiele symptomów endogennego starzenia się, a spadek aktywności biologicznej fibroblastów jest jednym z nich. Biorąc pod uwagę fakt, że są to komórki odpowiedzialne za syntezę kolagenu, zmiany w ich aktywności nie pozostają bez znaczenia dla prawidłowego funkcjonowania tkanki łącznej, w której kolagen jest głównym białkiem strukturalnym. Wiele substancji aktywnych stosowanych w recepturach terapeutycznych i suplementach wykazuje korzystny wpływ na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach skóry. Przykładami takich związków są wybrane fitohormony, takie jak kinetyna i N-6-benzyloadenina.

Poniższa praca dotyczy wpływu wybranych związków z grupy cytokinin – kinetyny i N-6-benzyloadeniny na biosyntezę kolagenu, syntezę białka oraz migrację komórek w normalnych warunkach fizjologicznych, bez zastosowania czynników stresowych. W naszych badaniach skupiliśmy się na najbardziej odpowiednim modelu *in vitro* – fibroblastach, które stanowią zdecydowaną większość wśród komórek budujących skórę ludzką. Badane związki analizowaliśmy w stężeniach ustalonych we wcześniejszych eksperymentach [2]. W poprzednio ustalonym zakresie stężeń dla każdego z analizowanych fitohormonów zbadaliśmy ich wpływ na zawartość białka całkowitego, kolagenu oraz na migrację komórek badaną testem Wound Healing Assay.

Materiały i metody

Związki chemiczne

Wszystkie reagenty: kinetyna, N-6-benzyloadenina, PBS (*phosphate-buffer saline*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), FBS (*Fetal Bovine Serum*) pochodziły z Sigma (St. Louis, MO, USA). Pozostałe wykorzystane w badaniach reagenty i rozpuszczalniki były czystości analitycznej. Plastik stosowany do hodowli komórek pochodził z firmy Sarstedt.

Linia komórkowa

Wpływ K i BA na wybrane parametry badany był przy użyciu normalnych fibroblastów skóry ludzkiej w warunkach fizjologicznych, bez zastosowania czynników stresowych. Linia komórkowa fibroblastów pochodziła z Katedry Biologii Komórki, Wydziałów Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kraków, Polska). Badania zostały wykonane w ramach pozwolenia nr R-I-002/42/2009 uzyskanego od Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Linia komórkowa fibroblastów była hodowana w medium DMEM suplementowanym 10% FBS w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Fibroblasty wysiewane w gęstości 1x10⁵ komórek/ml były inkubowane z i/lub bez badanych związków w płytkach 6-dołkowych w końcowej objętości medium – 2ml. Zawartość kolagenu w komórkach i w medium oraz stężenie białka całkowitego w komórkach były analizowane w zakresie stężeń kinetyny: 10⁻⁵ i 10⁻⁶M, oraz N-6-benzyloadeniny: 10⁻⁶ i 10⁻⁷M.

Badane fitohormony

K i BA były przechowywane w zamrażarce (poniżej -4°C), chronione przed światłem i dodawane do medium hodowlanego w takich ilościach, które dawały końcowe zakresy stężeń: 10⁻⁵M do 10⁻⁶M dla K i 10⁻⁶M do 10⁻⁷M dla BA. Komórki stanowiące kontrolę były inkubowane bez badanych fitohormonów.

Wound Healing Assay – test zranienia

Metoda ta służy do oceny aktywności substancji wpływających na ruchliwość i proliferację komórek *in vitro* [5]. Ma zastosowanie w badaniach nad gojeniem się ran i angiogenezą. Badano w ten sposób jak stymulacja określonymi cytokinami wpływa na ruchliwość komórek. Do eksperymentu użyto hodowli na poziomie 1 do 4 pasaży. Komórki hodowano w płytkach hodowlanych aż do uzyskania jednolitej warstwy komórek (pełnej konfluencji). Przygotowano roztwory medium z FBS oraz roztwory cytokinin o określonych stężeniach. Wszystkie roztwory powinny być przefiltrowane, aby zachować sterylność. Na dnie naczyń hodowlanych markerem narysowano linię. Przy użyciu sterylnych końcówek pipety automatycznej w jednolitej warstwie komórek wykonano rysę, a odklejone komórki usuwano przez 2-krotne płukanie płytek roztworem PBS. Do tak przygotowanych hodowli dodawano medium i fitohormony w stężeniu uznanym za najbardziej optymalne. Następnie wykonywano zdjęcia po 6, 12 i 24 godzinach. Po każdym wykonaniu zdjęć i pomiarów zmniejszającej się rysy zmieniano medium z dodatkiem fitohormonów.

Oznaczenie zawartości białka całkowitego w komórkach

Białko oznaczono metodą Lowry'ego [6]. Do 0,5 ml próby badanej oraz do 0,5 ml próby ślepej (1M roztwór NaOH) i do 0,5 ml roztworu wzorca – albuminy (0,15 mg/ml), dodano po 2,5 ml odczynnika miedziowego (sporzą-

dzono bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń), tj.: zmieszano 2% roztwór Na_2CO_3 w 0,1 M NaOH z 0,5% roztworem $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu w stosunku 50:1. Po 10 min. do mieszaniny dodano, stale mieszając, 0,25 ml 1M odczynnika Folina-Ciocalteu (przed użyciem rozcieńczono wodą destylowaną w stosunku 1:1). Próby inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej, a następnie odczytano wartość absorbancji przy 750 nm wobec próby ślepej.

Oznaczenie zawartości kolagenu w medium hodowlanym i w komórkach

Metoda ta jest oparta na spektrofotometrycznej obserwacji wiązania się barwnika Sirius red w nasyconym kwasie pikrynowym z kolagenem włókiennym (typ od I do V), zwłaszcza z jego fragmentem Gly-X-Y struktury helikalnej [7]. Metoda jest stosowana do pomiarów zawartości kolagenu w medium hodowlanym oraz w komórkach.

Przygotowano wzorcowe roztwory kolagenu poprzez rozpuszczenie kolagenu w 0,5M kwasie octowym, tak aby uzyskać ilości: 0 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 30 μg , 50 μg . Do roztworów wzorcowych, próby ślepej i prób badanych o objętości 50-100 μl dodano 1ml roztworu barwnika i mieszano delikatnie w temp. pokojowej przez 30 min. Wirowano próbki przy 10.000 obr/min. przez 5 min, aby osadzić kolagen. Ostrożnie usuwano supernatant, aby nie naruszyć osadu. Dodano 1ml 0,1M HCl do każdej próbki, aby usunąć niezwiązany barwnik. Ponownie wirowano próbki przy 10.000 obr/min przez 5 min. Następnie dodawano 1ml 0,5M NaOH do każdej próbki i vortexowano, aby uwolnić związany barwnik. Odczytywano absorbancję przy 540 nm. Zawartość kolagenu w próbach badanych odczytywano przy użyciu krzywej wzorcowej wprowadzonej do spektrofotometru.

Analiza statystyczna

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone zostały w 9 powtórzeniach i wyniki poddane zostały ocenie statystycznej metodą testu Tukeya i jednokierunkowej ANOVA w programie Statistica 12.5. Różnice uznawano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

Wyniki

Zawartość białka całkowitego w komórkach

W przypadku kinetyny wzrost zawartości białka był obserwowany w dniu pierwszym w stężeniu 10^{-5}M o 89,54% w stosunku do kontroli i w dniu dru-

gim w stężeniu 10^{-6}M o 46,4% w stosunku do kontroli (Rys. 1A). BA zdecydowanie słabiej oddziaływała na badany parametr (Rys. 2A). Najwyższy wzrost zawartości białka obserwowano w ostatnim dniu dla stężenia 10^{-6}M o 38,46% w stosunku do kontroli i dla stężenie 10^{-7}M o 84,73% w stosunku do kontroli w pierwszym dniu. W przypadku żadnej z cytokinin nie zaobserwowano spadku poziomu białka całkowitego poniżej poziomu kontroli. Badane związki działały na ten parametr stymulująco, ale uzyskane wyniki nie są istotne statystycznie.

Zawartość kolagenu w medium i w komórkach

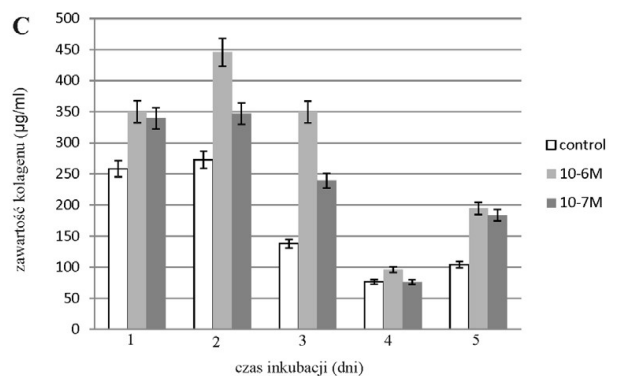
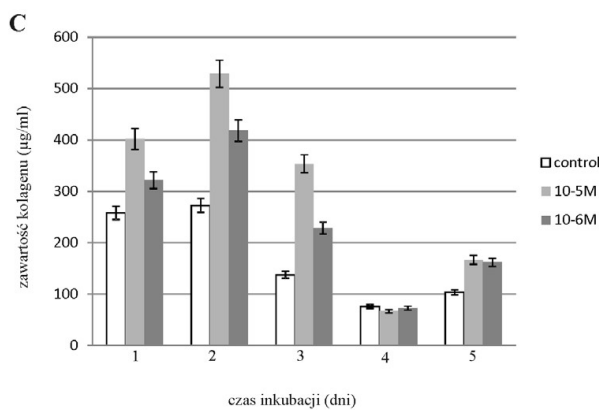
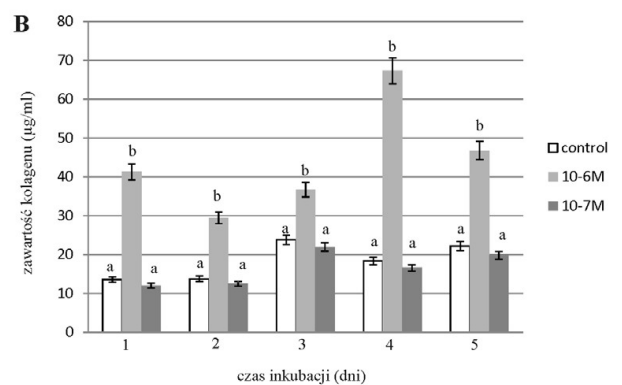
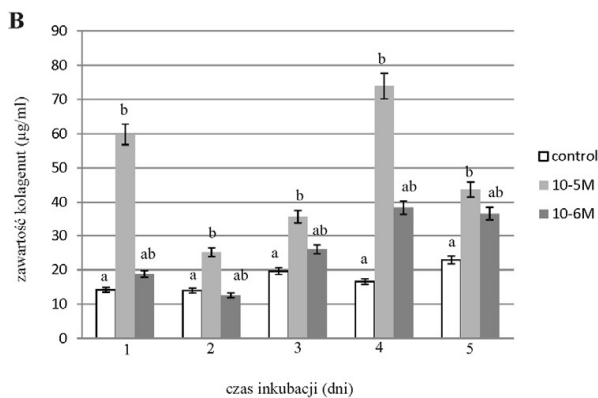
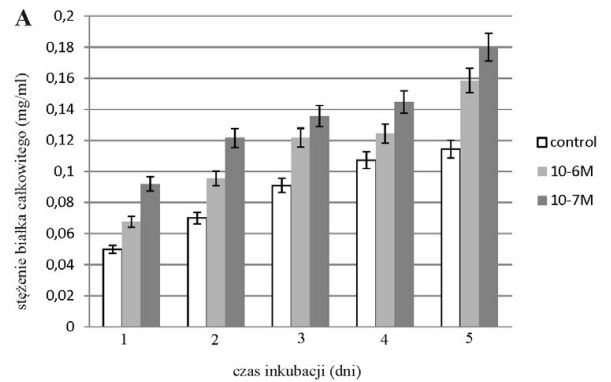
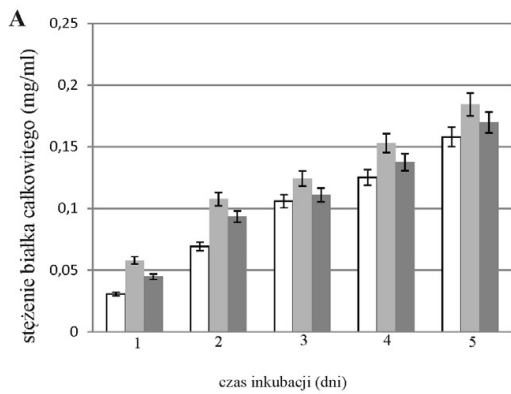
Kinetyna zdecydowanie bardziej stymuluje biosyntezę kolagenu i wydzielanie go do medium hodowlanego. W stężeniu 10^{-5}M w dniu pierwszym eksperymentu obserwowano bardzo duży wzrost zawartości tego białka, bo aż o 321,12% w stosunku do kontroli, a w dniu czwartym o 345,18%. Natomiast w stężeniu 10^{-6}M w dniu czwartym był obserwowany najintensywniejszy wzrost zawartości tego podstawowego białka strukturalnego. Wynosił on 131,32% w stosunku do hodowli kontrolnej (Rys. 1C, Rys. 1B). W przypadku BA znaczą stymulację wzrostu zawartości kolagenu w medium obserwowano w stężeniu 10^{-6}M . Natomiast w stężeniu 10^{-7}M obserwowany był spadek zawartości kolagenu o około 10% w każdym dniu eksperymentu (Rys. 2C, Rys. 2B). Uzyskane wyniki zawartości kolagenu w medium hodowlanym pod wpływem wybranych cytokinin są istotne statystycznie.

W hodowli stymulowanej K najwyższa zawartość kolagenu w komórkach była obserwowana w dniu trzecim eksperymentu. W stężeniu 10^{-5}M wynosiła ona 157%, a w 10^{-6}M – 66,34% w stosunku do kontroli. W czwartym dniu badania zaobserwowano spadek zawartości białka strukturalnego w obu badanych stężeniach. Wynosił on odpowiednio 12% dla stężenia 10^{-5}M i 4,73% dla stężenia 10^{-6}M w stosunku do hodowli kontrolnej. BA powodowała znaczny wzrost zawartości kolagenu w komórkach trzeciego i ostatniego dnia eksperymentu. W hodowli stymulowanej BA w stężeniu 10^{-7}M zaobserwowano spadek w zawartości kolagenu w dniu czwartym (0,44%). Wyniki obrazujące zmiany zawartości kolagenu w komórkach nie są istotne statystycznie.

Wpływ cytokinin na migrację fibroblastów

W przypadku stymulacji K w stężeniu 10^{-6}M obserwowano najszybsze przemieszczanie się komórek. Najwolniej komórki zasiedlały miejsce „zranienia”, gdy były stymulowane BA w stężeniu 10^{-7}M (Rys.3).

Wpływ kinetyny i N-6-benzyladeniny na migrację komórce...

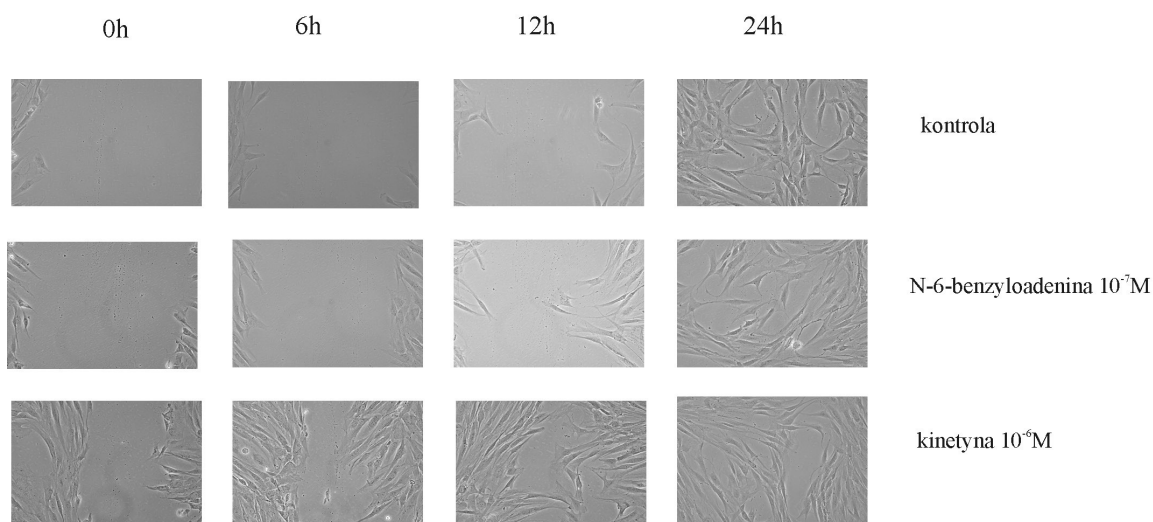


Ryc.1. Wpływ wybranych stężeń K na: A) zawartość białka całkowitego w fibroblastach podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD,

B) zawartość kolagenu w medium hodowlanym podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, różne litery (a, b) wskazują na wartości różnic istotne statystycznie ($\leq 0,05$) oszacowane za pomocą testu Tukeya, C) zawartość kolagenu w komórkach podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD

Ryc.2. Wpływ wybranych stężeń BA na: A) zawartość białka całkowitego w fibroblastach podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD,

B) zawartość kolagenu w medium hodowlanym podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, różne litery (a, b) wskazują na wartości różnic istotne statystycznie ($\leq 0,05$) oszacowane za pomocą testu Tukeya, C) zawartość kolagenu w komórkach podczas 5-dniowej inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD



Ryc. 3. Wpływ K i BA w dwóch wybranych stężeniach na migrację fibroblastów analizowaną w teście zranienia (Wound Healing Assay).

Dyskusja

Hormony pod względem struktury chemicznej stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków organicznych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesów biochemiczno-fizjologicznych zachodzących w komórkach i tkankach. Jednak w pewnym wieku obserwowany jest spadek produkcji hormonów przez organizm, zwłaszcza u kobiet. Może on mieć znaczny wpływ na stan fizjologiczny skóry i w pewnym stopniu na funkcjonowanie całego organizmu. Badania wykazały, że efekt zewnętrznego stosowania preparatów zawierających w składzie recepturowym hormony nie ogranicza się do miejsca aplikacji preparatu i może powodować występowanie wielu skutków ubocznych w stosunku do całego organizmu [8, 9]. Dlatego w wielu krajach, w tym także w Polsce, zabronione jest stosowanie w preparatach bez recepty hormonów estrogennych pochodzenia zwierzęcego. Fitohormony, podobnie jak hormony ludzkie, są związkami o dużej aktywności biologicznej mającymi charakter sygnałów chemicznych, produkowanymi przez określone tkanki i transportowanymi do obszarów, w których inicjują procesy wzrostowe i rozwojowe. Ponieważ niektóre z nich są podobne pod względem struktury chemicznej i działania do hormonów ludzkich, między innymi estrogenów, istnieje możliwość wykorzystania ich w medycynie. W odróżnieniu od hormonów człowieka ich odpowiedniki pochodzenia roślinnego cechuje szerokie spektrum

działania. Ten sam związek może wpływać na różne procesy metaboliczne. Rodzaj i efekt działania danego hormonu w dużym stopniu zależy od jego stężenia, miejsca działania oraz współdziałania z innymi fitohormonami [10]. Fitohormony, poza oddziaływaniem na receptory swoiste dla hormonów ludzkich, charakteryzują się bardzo silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Pełnią one rolę zmiataaczy wolnych rodników i hamują mutacje komórkowe, działając przeciwnowotworowo. Wszystkie stwierdzone korzystne efekty działania fitohormonów na organizm ludzki powodują, że pojawia się konieczność badania wpływu kolejnych grup tych związków na organizm ludzki. Taką grupą związków są m.in. cytokiny, takie jak K i BA.

Komórki stymulowane kinetyną nie podlegają tak szybkim, jak komórki kontrolne, zmianom morfologicznym związanym ze starzeniem się. Normalne fibroblasty skóry ludzkiej pochodzące od dorosłych dawców hodowane *in vitro* charakteryzują się wydłużonym, wrzecionowatym kształtem. Są cienkie, długie i układają się równolegle względem siebie w regularną, konfluentną warstwę. Z czasem komórki stają się heterogenne, duże, rozplaszczone, bezkształtne, wypełnione rezydualnymi ciałkami lizosomalnymi i często zawierają więcej niż jedno jądro. Zaobserwowano, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi [11], że komórki poddane działaniu kinetyny nie przechodzą opisanych zmian morfologicznych związanych ze starzeniem się w takim zakresie jak komórki w hodowli kontrolnej. Badania własne wykazały, że komórki nawet w ostatnim dniu eksperymentu utrzymują charakterystyczny wrzecionowaty kształt, układają się równolegle względem siebie i tworzą jedną warstwę. Kinetyna również wpływa na szybkość migracji fibroblastów, co wykazano w teście Wound Assay. Po utworzeniu w konfluentnej hodowli „zranienia”, komórki zasiedlają miejsce, które ma obrazować przerwana tkankę. Pod wpływem kinetyny w stężeniu $10^{-6}M$ zaobserwowano, że po 24 godzinach „rana” jest prawie całkiem pokryta komórkami. Kinetyna działa bardziej stymulująco na migrację komórek niż N-6-benzyloadenina.

Badania własne wykazały, że kinetyna wpływa bardziej stymulująco od benzyloadeniny na wzrost ilości komórek i zawartości w nich białek, zwłaszcza w pierwszych dniach eksperymentu. Dane literaturowe również potwierdzają wzrost zawartości białka w kulturach fibroblastów traktowanych kinetyną [11, 12]. Wpływ kinetyny na zawartość kolagenu w medium hodowlanym i w komórkach nie był dotychczas badany i nie ma żadnych danych literaturowych na ten temat. Badania własne wskazują, że hormon ten wzmaga biosyntezę tego białka, zwiększając jego zawartość. Szczególnie

intensywnie stymuluje ona biosyntezę kolagenu w stężeniu 10^{-5}M , podwyższając jego zawartość zarówno w medium hodowlanym, jak i w komórkach. Obserwowano intensywny wzrost zawartości kolagenu w pożywce w pierwszych dwóch dniach eksperymentu. W dniu trzecim odnotowano wzrost ilości tego białka w komórkach, po którym w 4 dniu nastąpił spadek nawet poniżej wartości kontrolnej, ale w tym samym czasie pojawił się wzrost ilości kolagenu w medium hodowlanym. Może to sugerować, że po zsyntetyzowaniu białko to zostało wydzielone do medium hodowlanego. Czwartego dnia, gdy w komórkach obserwowano spadek zawartości kolagenu, w medium następował wzrost jego ilości. Ponieważ dane literaturowe [12] wskazują, że kinetyna może oddziaływać na poziomie transkrypcji, translacji, post-translacyjnym i metabolicznym, to nie wiadomo, na którym etapie może stymulować biosyntezę kolagenu. Wyniki badań własnych potwierdzają, że kinetyna korzystnie oddziałuje na podstawowe składniki macierzy pozakomórkowej tworzące skórę właściwą. Według Kimura T. i wsp. skóra traktowana kinetyną wykazywała znacznie lepszą morfologiczną organizację fibroblastów w porównaniu do kontroli [13]. Przed stymulacją kinetyną w obrębie skóry właściwej widoczne były zgrubienia włókien kolagenowych mające nieregularny układ. Po 50 dniach działania kinetyny włókna kolagenowe odzyskiwały właściwą grubość i gęstość utkania oraz sposób rozłożenia kolagenu w tkance łącznej. Poprawa jakości składników macierzy pozakomórkowej, takich jak włókna kolagenu i elastyny, była obserwowana przez cały czas działania kinetyny na skórę. Doświadczenia były prowadzone na bezwłosych psach meksykańskich [13].

Badania własne potwierdziły, że benzyloadenina hamuje proliferację komórek. W stężeniach 10^{-6}M i 10^{-7}M działała stosunkowo najslabiej na zahamowanie podziałów w fibroblastach, dlatego też te stężenia były wykorzystane do dalszych badań i sprawdzenia wpływu benzyloadeniny na inne parametry biochemiczne, takie jak: zawartość białka całkowitego i kolagenu, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, peroksydacja lipidów, zawartość glutationu i grup sulfhydrylowych w komórkach [2]. W fibroblastach benzyloadenina wykorzystuje podobne mechanizmy hamowania proliferacji, jak w komórkach nowotworowych, tj. powoduje pojawienie się silnego i specyficznego hamowania ważnych kinaz białkowych CDK. Czynniki te odgrywają ważną rolę zarówno w fazie mitozy, jak i we wczesnych fazach podziału komórki (interfazie) [14]. Pomimo, że benzyloadenina hamuje proliferację komórek i w hodowli obserwowano niewiele fibroblastów będących w fazie mitozy, to jednak pod względem morfologicznym komórki

stymulowane tym hormonem utrzymują swój wydłużony kształt charakterystyczny dla komórek we wczesnej fazie wzrostu. Jest to zgodne z danymi Johnsona G.S. i wsp., że N-6 pochodne adeniny wpływają na kształt komórek, powodując ich wydłużanie się [15]. Ponadto związki, do których zalicza się również N-6-benzyloadeninę, powodują znaczne spowolnienie w przemieszczaniu się komórek i zwiększenie ich adhezji do podłoża. Jest to zgodne z wynikami badań własnych, które wskazują, że benzyloadenina w stężeniu 10^{-7} M najslabiej stymulowała migrację komórek w teście WOUND ASSAY. Podobne efekty w kształcie, migracji i adhezji komórek obserwowano podczas inkubacji komórek z potencjalnymi inhibitorami fosfodiesteraz, np.: 1-metylo-3-izobutyloksantyną, która powodowała podniesienie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP. Ponieważ poziom wewnątrzkomórkowego cAMP nie był dotąd bezpośrednio mierzony, nie wiadomo, czy benzyloadenina zmienia ten parametr w komórce. Istnieje także możliwość, że benzyloadenina zwiększa poziom cAMP w bardzo wyspecjalizowanym, małym obszarze komórki lub działa zupełnie niezależnie od cAMP. Benzyloadenina może aktywować kinazy białkowe lub razem z cAMP wpływać na wewnątrzkomórkową dystrybucję jonów Ca^{2+} , Na^{+} i K^{+} bądź też może bezpośrednio oddziaływać na mikrotubule i mikrofilamenty i zmieniać kształt komórki. Według danych literaturowych benzyloadenina i jej pochodne okazały się selektywnymi inhibitorami fosfodiesteraz (PDE). PDE są rodziną enzymów powszechnie występujących w tkankach ssaków, które poprzez hydrolizę cAMP i cGMP pośredniczą w transdukcji sygnałów komórkowych. Inhibicja PDE przez benzyloadeninę może być wykorzystana w potencjalnej terapii chorób związanych ze stanami zapalnymi, ponieważ enzymy te odgrywają dużą rolę w tworzeniu stanów zapalnych. Hamując aktywność PDE, benzyloadenina i jej pochodne hamują również syntezę czynnika martwicy nowotworów TNF- α , który jest kluczową cytokiną wpływającą na rozwój chorób o charakterze zapalnym. Dane literaturowe wskazują, że inhibitory PDE są również czynnikami anty-TNF- α . Są one stosowane w praktyce klinicznej w terapii wielu jednostek chorobowych, w których obserwowany jest stan zapalny, np.: astma, atopia skórna, przewlekła obturacyjna choroba płuc, reumatoidalne zapalenie stawów i choroby neurologiczne [16,17,18]. Benzyloadenina, która najprawdopodobniej również działa poprzez mechanizm hamowania fosfodiesteraz, wydaje się spełniać warunki, aby działać przeciwzapalnie i może być wykorzystana w terapii chorób przebiegających ze stanem zapalnym.

Stężenie cAMP w komórce zmienia się bardzo szybko w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały, którymi może być zwiększone stężenie benzyloadeniny. Benzyloadenina i jej pochodne selektywnie hamując aktywność PDE, zwłaszcza PDE4, mogą powodować akumulację cAMP w komórce. cAMP aktywuje kinazę białkową A zależną od cyklicznego AMP, która katalizuje fosforylację reszty seryny i treoniny w specyficznych białkach wewnątrzkomórkowych. Zmienia ich aktywność i może nawet wpływać na zmianę ekspresji genów. Białka regulatorowe powstające wskutek zwiększonej aktywności enzymów aktywowanych przez kinazy białkowe mogą wpływać na biosyntezę białka w komórce.

Najnowsze dane literaturowe jednak wskazują, że benzyloadenina aktywuje kinazę białkową A, ale na drodze mechanizmu niezależnego od cAMP, prawdopodobnie związanego z innymi ścieżkami sygnałowymi komórki, np. związanymi z TGF- β [19]. Jest to zgodne z wynikami badań własnych, które wskazują na aktywujący wpływ benzyloadeniny na biosyntezę białka, a nawet na biosyntezę podstawowego białka strukturalnego – kolagenu. Nie obserwowano żadnych spadków zawartości białka poniżej poziomu kontroli. Badana zawartość kolagenu wydzielanego przez komórki do medium hodowlanego wskazuje na silny efekty stymulujący benzyloadeniny w stężeniu 10^{-6} M, zwłaszcza w pierwszym i ostatnim dniu eksperymentu. W dniu trzecim jest zauważalny spadek, jednak ciągle zawartość badanego białka strukturalnego jest powyżej poziomu kontroli. W tym samym dniu (trzecim) stwierdzono duży wzrost zawartości kolagenu w komórkach, natomiast w pierwszym i czwartym dniu eksperymentu jego ilość w komórkach była dużo mniejsza niż dnia trzeciego. Stąd można wnioskować, że benzyloadenina aktywując kinazę białkową A, intensywnie stymuluje biosyntezę i wydzielanie kolagenu do medium hodowlanego już w pierwszych dwóch dniach hodowli, po czym zwiększa się synteza tego białka w komórkach (dnia trzeciego), a następnie zsyntetyzowany kolagen jest wydzielany do medium w dniu czwartym i piątym, powodując bardzo duży wzrost jego zawartości w pożywce, nawet do 265,7%. Natomiast benzyloadenina w stężeniu 10^{-7} M powoduje nieznaczny spadek zawartości kolagenu w medium hodowlanym, który utrzymuje się przez cały czas trwania 5-dniowego eksperymentu na poziomie około 10%. W fibroblastach pod wpływem benzyloadeniny w stężeniu 10^{-7} M obserwowano wzrost zawartości kolagenu w dniu pierwszym, trzecim i piątym, a w dniu drugim i czwartym niewielkie spadki zawartości badanego białka. Dane te wydają się potwierdzać hipotezę Swaney'a J.S. i wsp., że wysoki poziom cAMP hamuje biosyntezę

kolagenu [20]. Może to oznaczać, że aktywacja biosyntezy kolagenu przez benzyloadeninę zachodzi rzeczywiście na drodze niezależnej od poziomu cAMP, uwarunkowanej tylko aktywacją kinazy białkowej A, która zachodzi poprzez interakcję z TGF- β – czynnika stymulującego biosyntezę kolagenu. TGF- β aktywuje kinazę białkową A poprzez regulację kompleksu białek smad3/4 [21,22].

Badane fitohormony korzystnie wpływają na metabolizm, migrację i proliferację komórek skóry właściwej. Stymulują biosyntezę białka całkowitego, kolagenu i pozytywnie wpływają na podstawowe parametry stresu oksydacyjnego oraz zdolności przemieszczania się fibroblastów. Istnieją przypuszczenia, że kinetyna stosowana na skórę prawdopodobnie usuwa i niweluje uszkodzenia spowodowane nadmierną ekspozycją na promieniowanie UV. Włókna kolagenu i elastyny odzyskują właściwą strukturę, a ponadto zmniejsza się nadmierna pigmentacja skóry. Poza tym kinetyna zmniejsza TEWL i powoduje lepsze funkcjonowanie warstwy kolczystej skóry jako warstwy barierowej. Jest ona efektywna w niskich dawkach, co potwierdzają badania własne na fibroblastach, natomiast jej skuteczność w dużym stopniu zależy od czasu stosowania na skórę. Wykazano także, że związek ten nie ma właściwości alergizujących i może być stosowany nawet w przypadku wrażliwej skóry [23, 24, 25, 26, 27]. Znane i potwierdzone jest również działanie kinetyny, a zwłaszcza jej form rybozydowych na komórki nowotworowe, w których jest ona stymulatorem apoptozy. Nukleozydy i rybonukleozydy kinetyny mają działanie stymulujące apoptozę komórek nowotworowych, jednocześnie nie uszkadzają komórek zdrowych [28]. Stąd też można wnioskować, opierając się również na wynikach badań własnych, że kinetyna może mieć szerokie zastosowanie w terapii i profilaktyce wielu jednostek chorobowych dotyczących nie tylko skóry.

Natomiast benzyloadenina, której pochodne posiadają udowodnione działanie antykancerogenne, może znaleźć zastosowanie jako substancja terapeutyczna w stanach zapalnych, jak i w chorobach skóry związanych z zaburzeniami jej pigmentacji. Istnieje pewna korelacja między kancerogenezą u ludzi oraz u roślin. Czynniki odgrywające ważną rolę w regulacji różnicowania i rozwoju u roślin mogą również wpływać na różnicowanie ludzkich komórek, zarówno zdrowych, jak i patologicznie zmienionych, poprzez system transdukcji sygnału i dlatego mogą być klinicznie użyteczne w leczeniu różnych stanów chorobowych. Skuteczność ich działania wykazana w niniejszej pracy, w odniesieniu do komórek skóry, może wskazywać na ich potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Podziękowania:

Projekt badawczy został sfinansowany przez Wyższą Szkołę Medyczną w Białymstoku. Autorzy składają podziękowania Władzom Wyższej Szkoły Medycznej w Białymstoku za finansowe wsparcie projektu naukowego.

Literatura

- [1] Barciszewski J., Massino F., Clark B.F.C., Kinetin – a multiactive molecule, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 40, s. 182–192.
- [2] Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Czerpak R., N6-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016a, 413(1–2), s. 97–107.
- [3] Jabłońska-Trypuć A., Pankiewicz W., Czerpak R., Traumatic acid reduces oxidative stress and enhances collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts, *Lipids*, 2016b, 51(9), s. 1021–1035.
- [4] Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Rosochacki S., Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016c, 31, s. 177–183.
- [5] Denker S.P., Barber D.L., Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1, *Journal of Cell Biology*, 2002, 159, s. 1087–1096.
- [6] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193, s. 265–275.
- [7] Junquiera L.C., Junqueira L.C., Brentani R.R., A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen, *Analytical Biochemistry*, 1979, 94, s. 96–99.
- [8] Hengge U.R., Ruzicka T., Schwartz R.A., Cork M.J., Adverse effects of topical glucocorticosteroids, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2006, 54(1), s. 1–15.
- [9] Stevenson S., Thornton J., Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs., *Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2(3), s. 283–297.
- [10] Singh D., Gupta R., Saraf S.A., Herbs-are they safe enough? An overview, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(10), s. 876–898.
- [11] Rattan S.I., Clark B.F., Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 201, s. 665–672.
- [12] Barciszewski J., Rattan S.I.S., Siboska G., Clark B.F.C., Kinetin – 45 years on, *Plant Science*, 1999, 148, s. 37–45.
- [13] Kimura T., Doi K., Depigmentation and rejuvenation effects of kinetin on the aged skin of hairless descendants of Mexican hairless dogs, *Rejuvenation research*, 2004, 7, s. 32–39.
- [14] Jabłońska-Trypuć A., Czerpak R., Cytokiny, ich aktywność biochemiczna w procesach podziałów, starzenia się i apoptozy komórek ludzkich i zwierzęcych, *Postępy Biologii Komórki*, 2009, 36, s. 135–154.
- [15] Johnson G.S., D'armiento M., Carchman R.A., N6-substituted adenines induce cell elongation irrespective of the intracellular cyclic AMP levels, *Experimental Cell Research*, 1974, 85, s. 47–56.

- [16] Boichot E., Wallace J.L., Germain N., Corbel M., Lugnier C., Lagente V., Bourguignon J.J. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 292, s. 647–653.
- [17] Lugnier C., Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents, *Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 109, s. 366–398.
- [18] Reimund J.M., Raboisson P., Pinna G., Lugnier C., Bourguignon J.J., Muller C.D., Anti-TNF-alpha properties of new 9-benzyladenine derivatives with selective phosphodiesterase-4- inhibiting properties, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 288, s. 427–434.
- [19] Kim S., Lee J., Jung E., Lee J., Huh S., Hwang H., Kim Y., Park D., 6-Benzylaminopurine stimulates melanogenesis via cAMP-independent activation of protein kinase A, *Archives of Dermatological Research*, 2009, 301, s. 253–258.
- [20] Swaney J.S., Roth D.M., Olson E.R., Naugle J.E., Meszaros J.G., Insel P.A., Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102, s. 437–442.
- [21] Jabłońska-Trypuć A., Farbiszewski R., Collagen – structure, function and biosynthesis in normal and aged human skin, *Revista SRCC*, 2008, 8, s. 13–15.
- [22] Ghosh A.K., Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: Implication in fibrosis, *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227, s. 301–314.
- [23] Czerpak R., Jabłońska A., Zastosowanie cytokinin i izoflawonoidów w kosmetyce i terapii (I), *Medycyna Estetyczna i Przeciwstarzeniowa*, 2005a, 11, s. 73–79.
- [24] Czerpak R., Jabłońska A., Zastosowanie cytokinin i izoflawonoidów w kosmetyce i terapii (II), *Medycyna Estetyczna i Przeciwstarzeniowa*, 2005b, 12, s. 121–129.
- [25] Huang C.K., Miller T.A., The truth about over-the-counter topical anti-aging products: a comprehensive review, *Aesthetic Surgery Journal*, 2007, 27(4), s. 402–412.
- [26] Tournas J.A., Lin F.H., Burch J.A., Selim M.A., Monteiro-Riviere N.A., Zieliński J.E., Pinnell S.R., Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamins C and E with ferulic acid, *Journal of Investigative Dermatology*, 2006, 126, s. 1185–1187.
- [27] Wu J.J., Weinstein G.D., Kricorian G.J., Korneili T., McCullough J.L., Topical kinetin 0.1% lotion for improving the signs and symptoms of rosacea, *Clinical and Experimental Dermatology*, 2007, 32, s. 693–695.
- [28] Meisel H., Günther S., Martin D., Schlimme E., Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems, *FEBS Letters*, 1998, 433, s. 265–268.

Do cytowania:

Jabłońska-Trypuć A., Pankiewicz W., Czerpak R., Wpływ kinetyny i N-6-benzyladeniny na migrację komórek oraz biosyntezę kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej, *Herbalism*, 2017, 1(3), s. 55–69