

Wpływ wybranych peptydów i ich kompleksów z miedzią na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w ludzkich fibroblastach skóry

Influence of selected peptides and their copper complexes on antioxidant enzyme activities in human skin fibroblasts

Arkadiusz Gruchlik, Ewa Chodurek, Zofia Dzierżewicz

Katedra i Zakład Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu,
kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. Zofia Dzierżewicz

Post Dermatol Alergol 2010; XXVII, 1: 29–35

Streszczenie

Zmarszczki na skórze są spowodowane zmianami degeneracyjnymi białek macierzy pozakomórkowej oraz nagromadzeniem się reaktywnych form tlenu w komórkach. Zwiększanie syntezy nowych białek w skórze może poprawić wygląd zmarszczek. Za syntezę nowego kolagenu czy innych białek w obrębie tkanki skórnej są odpowiedzialne przede wszystkim fibroblasty. Istnieje wiele produktów o działaniu tzw. przeciwzmarszczkowym, np. tretinoina czy retinol, które wygładzają zmarszczki przez zwiększenie produkcji kolagenu, ale z powodu właściwości drażniących ich zastosowanie jest ograniczone. Ostatnio dużo uwagi poświęca się peptydom i ich kompleksom z miedzią, które w przeciwieństwie do tretinoiny są dobrze tolerowane. Peptydy te po raz pierwszy zostały opisane jako komórkowe czynniki wzrostu. Omówiono ich rolę w procesach gojenia się ran i reparacji tkanek. Peptydy, takie jak Gly-His-Lys (GHK), mogą służyć jako nośnik i stabilizator jonów miedzi. Jako kosmeceutyki mogą wpływać na jędrność skóry, wygładzać zmarszczki i hamować hiperpigmentację. Związki te biorą udział w syntezie kolagenu i elastyny, hamują aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej oraz zmniejszają aktywność kolagenazy. Miedź jest kofaktorem enzymu dysmutazy ponadtlenkowej SOD, dlatego wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Głównym celem niniejszych badań była ocena wpływu wybranych peptydów Gly-Gly-His, Gly-His-Lys oraz ich kompleksów z miedzią, a także produktu fermentacji białek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, hodowanych na pożywce wzbogaconej o miedź Oligolides Copper (Creations Couleurs®), na aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz proliferację fibroblastów skóry linii NHDF. Wyniki badań dowiodły, że za proces proliferacji była odpowiedzialna frakcja peptydowa. Jony miedzi 2-krotnie zwiększyły aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Zdolności kompleksujące badanych peptydów (*in vitro*) mogą być odpowiedzialne za zmniejszenie dostępności wolnej frakcji jonów miedzi.

Słowa kluczowe: proliferacja fibroblastów skóry, enzymy antyoksydacyjne, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa, glicylohistydylozyna, glicyloglicylohistydyna, kompleksy peptydów z miedzią, kosmetyki przeciwzmarszczkowe.

Abstract

Wrinkles in the skin are caused by degenerative changes in the proteins of the dermal extracellular matrix and by generation of reactive oxygen particles in skin cells. Stimulation of neosynthesis of these proteins in the dermis may result in improvement of wrinkles. Fibroblasts are responsible for new collagen and other protein synthesis in the dermis. There are many anti-wrinkle products, for example tretinoin or retinol, which improves fine wrinkles by increasing collagen production, but these compounds have irritating properties. Recently much attention has been focussed on the peptides and copper peptide complexes, which have good skin tolerance. These peptides were first

Adres do korespondencji: mgr Arkadiusz Gruchlik, Katedra i Zakład Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu, ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec, e-mail: agruchlik@sum.edu.pl

described as cell growth factors but recent data suggested a physiological role related to the process of wound healing and tissue repair. Peptides such as Gly-His-Lys (GHK) may be used to stabilize and deliver copper into cells. As cosmeceuticals, copper peptides could improve skin firmness, fine wrinkles, and hyperpigmentation. They participate in collagen and elastin formation, downregulate matrix metalloproteinases, and reduce the activity of collagenase. Copper is a required cofactor for the enzyme superoxide dismutase (SOD), so it has antioxidant properties. The aim of the study was to evaluate the influence of selected peptides Gly-Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes and water and *Saccharomyces/copper ferment* (Oligolides Copper®) on antioxidant enzyme activities and on proliferation of dermal fibroblast (NHDF) cell lines. The peptide fraction was responsible for increased fibroblast proliferation. Copper ions increase SOD activity twofold. Complexing properties of the peptides (*in vitro*) could be responsible for decreasing the available free copper ions fraction.

Key words: fibroblast skin proliferation, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glycyl-histidyl-lysine, glycyl-glycyl-histidine, copper-peptide complexes, anti-wrinkle cosmetics.

Wprowadzenie

Istnieje wiele zabiegów, które stosuje się w celu zahamowania starzenia się skóry. Jedną z najbardziej popularnych i nieinwazyjnych metod jest miejscowe stosowanie kosmetyków. Kosmetyki, które mają za zadanie hamować efekt starzenia się skóry, zwane są popularnie *anti-aging* lub *anti-wrinkle cosmetics*. Zawierają one wiele związków zarówno pochodzenia roślinnego (np. fitoestrogeny, resweratrol, piktogenol, ekstrakty z mitorzębu japońskiego, wąkroty azjatyckiej), jak i chemicznego (retinoidy, palmitynian askorbylu, octan tokoferolu). Każda z metod ma wady i ograniczenia. Kwas retinowy wolno remodeluje tkankę skórną, ale kosztem przewlekłego podrażnienia i zaczerwienienia. Melatonina czy witamina C zwiększają syntezę kolagenu. Zwiększona ilość kolagenu w obrębie skóry nie jest jednak wystarczająca. Na pewnym etapie przebudowy skóry potrzebna jest aktywacja angiogenezy, zwiększona synteza elastyny, proteoglikanów i glikozaminoglikanów [1, 2]. Nawet kontrolowane procesy uszkodzenia skóry, takie jak peeling, dermabrazja czy techniki laserowe, są skuteczne tylko wtedy, gdy tkanka skórną jest w stanie prawidłowo zregenerować się po zakończonej terapii.

Wciąż poszukuje się nowych związków, które mogłyby wpływać na przebudowę skóry i jednocześnie zwiększać jej zdolność do regeneracji. Ostatnio dużo uwagi poświęca się biologicznie aktywnym peptydom, a szczególnie ich połączeniom z jonami miedzi (Cu^{2+}) CPs (*copper peptides*) [3]. Niskocząsteczkowe peptydy, w zależności od pełnionych funkcji, można podzielić na trzy podstawowe grupy: peptydy sygnałowe (heksapeptyd Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, lipidopentapeptyd Palmitoilo-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser SYN®-COLL), peptydowe inhibitory neurotransmiterów (toksyna botulinowa, Argirelina®, acetyloglutamylheksapeptyd-1, Leuphasyl®, SYN-AKE®) oraz peptydy transportujące [1, 4, 5]. Peptydy transportujące ze względu na budowę strukturalną i przestrzenną są zdolne do wiązania innych substancji, zwiększając ich rozpuszczalność, trwałość czy biodostępność. Najczęściej są to di-, tri- i tetrapeptydy dobrze rozpuszczalne w wodzie (np. Gly-His-Lys, Gly-His-Lys-His, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Gly, Ala-Gly-His). Peptydy

transportują głównie jony metali (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+}). Do najbardziej znanych peptydów transportujących jony Cu^{2+} należy tripeptyd Gly-His-Lys (GHK) oraz Gly-Gly-His (GGH) [6]. Kompleks GHK-Cu w stężeniach, rzędu 10^{-10} M, stymuluje aktywność fibroblastów, przyspiesza biosyntezę kolagenu, elastyny, glikoaminoglikanów, siarczanu chondroityny i siarczanu dermatanu. Zwiększa aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, takich jak MMP-2 i MMP-9, oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMP-1 i TIMP-2 [7]. Wpływ GHK-Cu na przebudowę macierzy pozakomórkowej oraz procesy angiogenezy, szczególnie w obrębie tkanki skórnej, wykorzystano w leczeniu trudno gojących się ran u zwierząt [8]. Efektem związania jonów Cu^{2+} przez GHK jest zahamowanie procesów autooksydacyjnych. Dotyczy to zarówno miedziozależnego utleniania niskocząsteczkowych lipoprotein LDL [9], jak i hamowania procesów oksydacyjnych, np. peroksydacji lipidów w uszkodzonych tkankach, katalizowanych przez dwuwartościowe jony żelaza (Fe^{2+}) [10]. W obrębie cytoplazmy lub mitochondrium Cu^{2+} ulegają redukcji do Cu^+ . W normalnych warunkach w komórce wolne, tj. niezwiązane, jony Cu^+ nie występują, ponieważ są szybko wychwytywane przez zredukowaną formę glutationu GSH i w takiej formie przekazywane do metalotioneiny. Pojawienie się wolnych Cu^{2+} może prowadzić do stresu oksydacyjnego. Jony Cu^+ – podobnie jak Fe^{2+} – w reakcji Fentona mogą ulec procesowi utleniania. Miedź wchodzi jednak w skład wielu metaloenzymów, bierze udział w biosyntezie kolagenu, elastyny i glikoaminoglikanów, w procesie gojenia się ran, wchłanianiu i transporcie żelaza, metabolizmie kwasów tłuszczowych, syntezie RNA oraz melanogenezie [11, 12].

Cel

Celem pracy była ocena wpływu tripeptydów GGH i GHK oraz ich kompleksów z miedzią na proces proliferacji i aktywność enzymów antyoksydacyjnych, tj. dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i reduktazy glutationowej, w ludzkich prawidłowych fibroblastach skóry.

Materiał i metody

Materiał użyty do badań oraz stosowane odczynniki

Materiałem użytym do badań były prawidłowe ludzkie fibroblasty skóry linii NHDF (Normal Human Dermal Fibroblast). Hodowle prowadzono w inkubatorze firmy Nuaire (model NU480E), w temperaturze 37°C, w atmosferze składającej się w 95% z powietrza i 5% z dwutlenku węgla, przy wilgotności wynoszącej 95%. Komórki hodowano w naczyniach polistyrenowych o powierzchni 25 cm² (Nunc EasY Flask) zaopatrzonych w filtry bakteriologiczne. Komórki pasażowano co 10 dni z zastosowaniem roztworu zawierającego 0,25% trypsyny z dodatkiem 1 mM EDTA • 4 Na (Life Technologies). Fibroblasty hodowano w zbufoowanym medium hodowlanym (MEM, Sigma) zawierającym 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, Gibco) oraz 100 U/ml penicyliny (Sigma) i 100 µg streptomycyny (Sigma). Do badań użyto: 100-milimolowego wodnego roztworu tripeptydu Gly-Gly-His (Sigma), 100-milimolowego wodnego roztworu dwuwodnego chloru miedzi (II) CuCl₂ × 2 H₂O (Sigma), 25-milimolowego roztworu soli octanowej tripeptydu Gly-His-Lys (Sigma) oraz produktu fermentacji białek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych na pożywkę wzbogaconą o miedź Oligolides Copper® [INCI, Water (and) Saccharomyces/Copper Ferment (and) Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben, Creations Couleurs]. Preparat Oligolides Copper® do badań udostępniła firma PPH Ryszard Kaczmarek i Synowie sp. z o.o.

Warunki prowadzenia hodowli eksperymentalnej oraz przygotowanie materiału do badań

Hodowlę eksperymentalną inicjowano poprzez wprowadzenie 10⁵ komórek NHDF, zawieszonych w 12 ml medium, do szalek o powierzchni 56 cm² (Nunclon™Δ Dishes). Następnie dodawano medium zawierające testowane peptydy i ich kompleksy miedziowe (1 nM GGH, 1 nM GGH-Cu, 1 nM GHK, 1 nM GHK-Cu, 1 nM CuCl₂). Komórki w obecności badanych związków hodowano przez 4 doby bez zmiany pożywki na świeżą, później płukano 2-krotnie RPMI-1640 (4°C) i zdrapywano, a otrzymaną zawiesinę wirowano przez 5 min przy 13 tys. obrotów na minutę (4°C). Komórki sonifikowano w buforze fosforanowym za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego (Bandelin Elektronic UW2070) przez 30 s (3 cykle, 70% mocy, 4°C). Powstały homogenat wirowano przez 10 min przy 15 tys. obrotów na minutę (4°C).

Ocena proliferacji i aktywności metabolicznej komórek NHDF

W celu określenia wpływu badanych związków na proces proliferacji fibroblastów wykorzystano komercyjnie dostępny test In Vitro Toxicology Assay Kit XTT Based TOX-2

(Sigma), którego głównym składnikiem jest sól sodowa 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-2H-tetrazolinum-5-karboksyanilidu (XTT). Badanie wykonano w 96-dołkowej mikroplacie (Corning Incorporated Costar®). Do każdej studzienki wprowadzano po 5 tys. komórek w 200 µl pożywki, a następnie po 24 godz. medium hodowlane zawierające badane związki. Tak przygotowaną mikroplaczkę inkubowano przez 72 godz. w standardowych warunkach ciśnienia i temperatury. Intensywność powstałego zabarwienia mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ = 450 nm, stosując czynniki mikroplaczek TRIAD LT (Dynex Technologies).

Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz peroksydazy i reduktazy glutationowej (GPx i GR) oznaczono za pomocą komercyjnie dostępnych testów firmy Randox Laboratories. Badano poziom absorpcji (dla SOD przy λ = 505 nm, dla GPx przy λ = 340 nm, dla GR przy λ = 340 nm). Pomiarów dokonano w odstępach 30-sekundowych przez 3 min w temperaturze 37°C. Jako jednostkę aktywności SOD przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje 50-procentowe zahamowanie szybkości reakcji powstawania formazanu. Jako jednostkę aktywności GPx przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 min utlenia 1 µM GSH (0,5 µM NADPH). Jako jednostkę aktywności GR przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 min utlenia 1 nM NADPH. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych przeliczono na zawartość białka w badanym homogenacie. Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda.

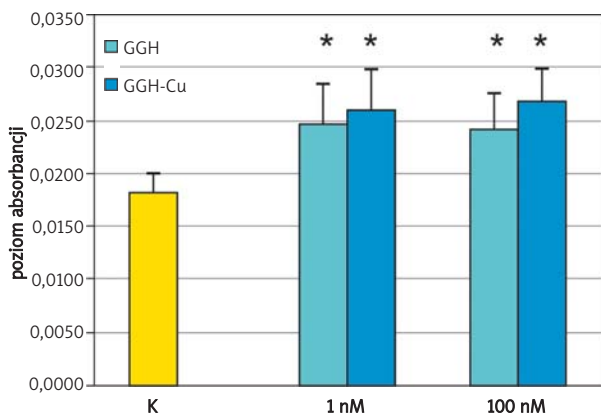
Analiza statystyczna

Wartości na rycinach są średnimi arytmetycznymi (x) z pomiarów wykonanych na materiale pochodzącym z trzech, tak samo traktowanych, hodowli. Miarą rozproszenia było odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, wykorzystując program komputerowy STATISTICA 6.0. W obliczeniach przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Grupy homogenne na poziomie 95% przedziału ufności wyróżniono metodą opartą na najmniejszych istotnych różnicach (test *post-hoc* Tukeya). Podstawą do przyjęcia założenia o jednorodności wariancji było zastosowanie testu Levena.

Wyniki

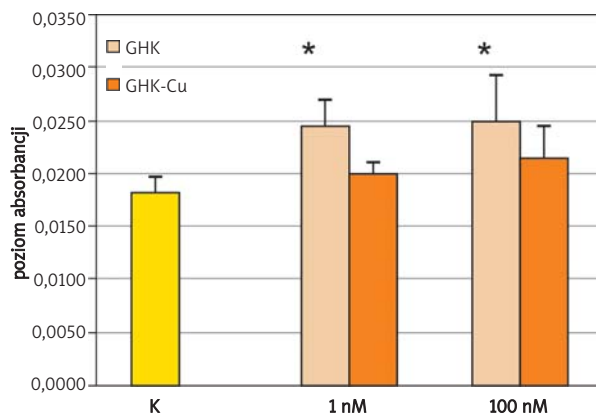
Ocena wpływu peptydów oraz ich kompleksów z miedzią na proliferację ludzkich fibroblastów skóry

Pierwszym etapem badań była ocena wpływu 1-nanomolowego i 100-nanomolowego roztworu CuCl₂, GGH, GGH-Cu, GHK, GHK-Cu oraz 3-procentowego roztworu



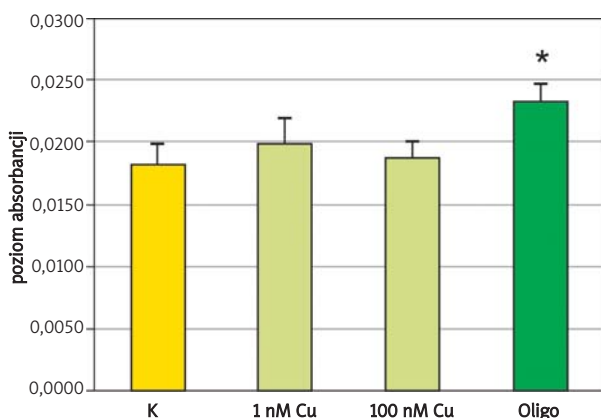
Ryc. 1. Porównanie wpływu 1-nanomolowego i 100-nanomolowego stężenia GGH i jego kompleksów z miedzią na proliferację ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz.

K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)



Ryc. 2. Porównanie wpływu 1-nanomolowego i 100-nanomolowego stężenia GHK i jego kompleksów z miedzią na proliferację ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz.

K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)



Ryc. 3. Wpływ 1-nanomolowego i 100-nanomolowego stężenia CuCl_2 oraz 3-procentowego roztworu Oligolides Copper® na proliferację ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz.

K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)

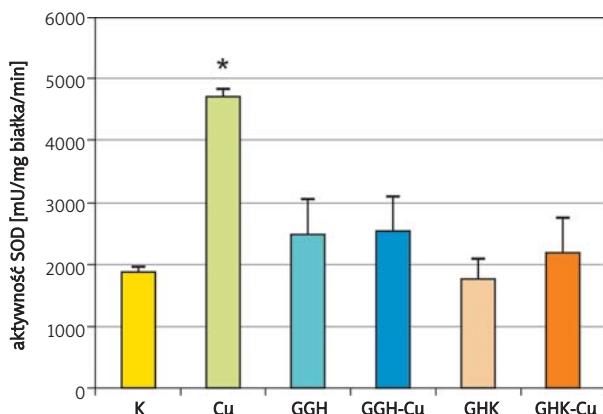
względem 1-nanomolowego i 100-nanomolowego roztworu CuCl_2 (odpowiednio $p = 0,0003$ i $p = 0,003$). Wydaje się, że miedź w zastosowanych stężeniach nie wpływa na proces proliferacji komórek. Dodatek peptydów wpływa na proliferację. Niewielka różnica między średnią liczbą komórek w kontroli a komórek narażonych na badane związki może być spowodowana bardzo wolnym zwiększeniem się liczby badanych komórek. Zbadano również wpływ dodatku CuCl_2 do roztworów GGH i GHK. Kompleks GGH-Cu zwiększa proces proliferacji (dla 1-nanomolowego GGH-Cu $p = 0,001$, dla 100-nanomolowego GGH-Cu $p = 0,0002$). Aktywność proliferacyjna komórek hodowanych w obecności GGH i GGH-Cu nie różni się, dlatego dodatek miedzi do roztworów GGH nie wpływa na proces proliferacji. W przypadku tripeptydu GHK zaobserwowano wręcz zmniejszenie proliferacji po dodaniu Cu^{2+} (ryc. 1.–3.).

Ocena wpływu peptydów oraz ich kompleksów z miedzią na aktywność enzymów SOD, GPx i GR w fibroblastach skóry

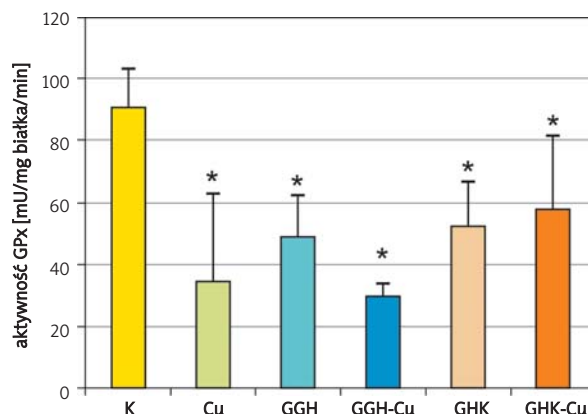
W fibroblastach skóry inkubowanych 4 doby w obecności 1-nanomolowego roztworu peptydów GGH i GHK oraz ich kompleksów z miedzią GGH-Cu i GHK-Cu nie zaobserwowano wzrostu aktywności SOD. W przeciwieństwie do peptydów prawie 2-krotny wzrost aktywności odnotowano po zastosowaniu CuCl_2 . Wydaje się, że dodatek peptydów nie wpływa na aktywność SOD, a ich zdolność do kompleksowania Cu^{2+} może przyczyniać się wręcz do zmniejszenia tej aktywności (ryc. 4.).

Z przedstawionych badań wynika, że 1-nanomolowe roztwory peptydów, ich kompleksów z miedzią oraz samej miedzi zmniejszają aktywność GPx (ryc. 5.). W przeciwień-

Oligolides Copper® na proliferację ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF. Kontrolę dla różnych stężeń tripeptydów GGH i GHK stanowiły komórki hodowane w pożywce niezawierającej badanych związków. Tripeptyd GGH w zastosowanych stężeniach 1 nM ($p = 0,003$) i 100 nM ($p = 0,007$) istotnie zwiększał proces proliferacji fibroblastów. Podobny efekt zauważono w przypadku 1-nanomolowego ($p = 0,0002$) i 100-nanomolowego ($p = 0,0001$) tripeptydu GHK oraz 3-procentowego preparatu Oligolides Copper® ($p = 0,04$). Trzyprocentowy roztwór Oligolides Copper® zwiększał proces proliferacji badanych komórek



Ryc. 4. Aktywność SOD w fibroblastach skóry linii NHDF hodowanych 4 doby w obecności 1-nanomolowych roztworów CuCl_2 , GGH, GHK, GGH-Cu i GHK-Cu. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz. K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)

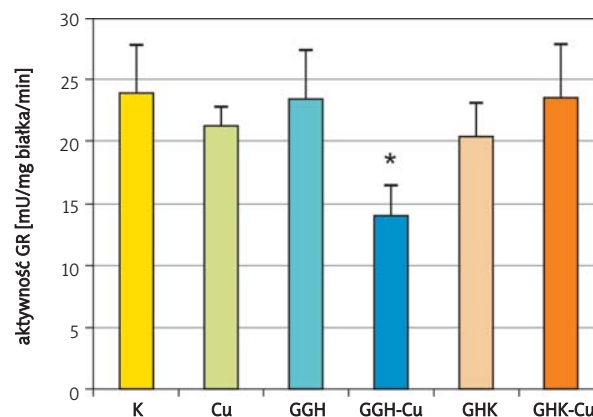


Ryc. 5. Aktywność GPx w fibroblastach skóry linii NHDF hodowanych 4 doby w obecności 1-nanomolowych roztworów CuCl_2 , GGH, GHK, GGH-Cu i GHK-Cu. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz. K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)

stwie do GPx, nie zaobserwowano wpływu 1-nanomolowych roztworów peptydów, ich kompleksów z miedzią oraz miedzi na aktywność GR ($p < 0,05$, ANOVA) (ryc. 6.).

Omówienie wyników

Reaktywne formy tlenu (RFT) w komórkach są naturalnymi produktami metabolizmu tlenowego i w stężeniach fizjologicznych pełnią ważne funkcje regulacyjne, m.in. przekazują sygnały wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe [13]. Do najczęściej spotykanych RFT należą: anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}), tlenek azotu (NO) oraz ozon (O_3). Zaburzenie fizjologicznej równowagi między wytwarzaniem RFT a ich „zmiataniem” przez enzymy antyoksydacyjne prowadzi do stresu oksydacyjnego. Szczególnie dużo RFT powstaje w komórkach skóry, która jest narażona na działanie wielu czynników środowiskowych, m.in. promieniowanie ultrafioletowe. Znajdujące się w komórkach witaminy A, C, E, Zn, Se, β -karoten, flawonoidy, enzymy antyoksydacyjne, takie jak: SOD, katalaza glutationowa, GPx i GR, chronią nas przed szkodliwym działaniem RFT. Dysmutaza ponadtlenkowa należąca do oksydoreduktaz katalizuje reakcję dysmutacji $\text{O}_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 i O_2 [14]. Jest ona najważniejszym enzymem antyoksydacyjnym skóry. Analizując wpływ 1-nanomolowych roztworów wodnych peptydów Gly-Gly-His (GGH) czy Gly-His-Lys (GHK) oraz ich kompleksów z miedzią GHK-Cu i GGH-Cu na aktywność SOD w ludzkich fibroblastach skóry linii NHDF, nie zaobserwowano wzrostu aktywności SOD. W przeciwieństwie do peptydów, prawie 2-krotne zwiększenie aktywności zaobserwowano po zastosowaniu 1-nanomolowego roztworu CuCl_2 . Miedź jest mikroelementem niezbędnym dla pra-



Ryc. 6. Aktywność GR w fibroblastach skóry linii NHDF hodowanych 4 doby w obecności 1-nanomolowych roztworów CuCl_2 , GGH, GHK, GGH-Cu i GHK-Cu. Komórki hodowano w obecności badanych związków przez 72 godz. K – grupa kontrolna, $x \pm SD$, $n = 3$, $p < 0,05$ vs grupa kontrolna (ANOVA)

widłowego przebiegu procesów fizjologicznych [15]. Niedobór miedzi u szczurów może prowadzić do zmniejszenia aktywności SOD w tkankach, czego efektem jest zwiększona liczba produktów peroksydacji lipidów w obrębie serca, wątroby i trzustki, np. malonyldialdehydu MDA [16, 17]. Badając stabilność SOD, wykazano, że jony Cu^{2+} zwiększają odporność termiczną tego białka znacznie silniej niż Zn^{2+} [18]. Warto zauważyć, że nadmiar miedzi w diecie jest niewskazany ze względu na jej właściwości prooksydacyjne [19].

Wpływ miedzi na procesy oksydoredukcyjne skóry wykorzystano w przemyśle kosmetycznym. Wodne roztwory CuCl_2 czy CuSO_4 , dodawane do kremów czy emulsji,

charakteryzują się małą biodostępnością, w związku z tym również małą skutecznością. Wiąże się to przede wszystkim z wielkością cząsteczki, właściwościami fizykochemicznymi, które utrudniają przenikanie przez barierę białkowo-lipidową, jaką jest skóra. Poprawę biodostępności Cu^{2+} realizuje się poprzez wiązanie ich ze specyficznym nośnikiem. Do takich nośników zalicza się przede wszystkim peptydy, takie jak GHK czy GGH, które tworzą trwałe kompleksy z miedzią. Kompleks GHK-Cu w warunkach *in vitro* ma zdolność przenikania przez warstwę rogową zarówno z roztworów wodnych, jak i emulsji O/W, co warunkuje jego aktywność biologiczną. Tripeptyd GHK-Cu stanowi więc efektywny transporter dla Cu^{2+} , znacznie zwiększając szybkość ich penetracji przez warstwę rogową naskórka [20]. Do GHK przyłącza się również hydrofobowe ugrupowanie R, którym najczęściej są kwasy tłuszczowe, m.in. heksanowy (hexa-GHK), dekanowy (deca-GHK) czy mirystynowy (myr-GHK). Dobrym rozwiązaniem jest także aplikacja związków miedzi w postaci liposomów [21]. Oprócz kwasów tłuszczowych, do cząsteczki GHK można przyłączyć biotynę. Taki biotynylowany GHK inkorporowany do matrycy kolagenowej zwiększał w obrębie gojącej się rany ponad 9-krotnie stężenie Cu^{2+} , zwiększał aktywność Cu/Zn-SOD, stężenie glutationu, kwasu askorbinowego oraz proliferację fibroblastów i mastocytów [22, 23].

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazały, że za pobudzenie aktywności SOD są odpowiedzialne nieskompleksowane jony Cu^{2+} . Zastosowane w warunkach *in vitro* peptydy zmniejszają wolną pulę tych jonów, przez co zmniejszają aktywność SOD. W warunkach *in vivo* w skórze znajduje się wiele peptydaz, które rozkładają peptydy transportujące, zwiększając przy tym stężenie Cu^{2+} . Peptydy odgrywają ważną rolę nośnikową, ale po przedostaniu się do miejsca działania mogą także zmniejszać dostępność Cu^{2+} . Dysmutaza ponadtlenkowa chroni ludzkie keratynocyty skóry przed uszkodzeniami indukowanymi przewlekłą ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe typu B [24]. Z tego względu wydaje się celowe wprowadzanie do preparatów fotoochronnych, obok filtrów przeciwsłonecznych, także związków stymulujących aktywność SOD [25].

Peptydy GGH czy GHK, oprócz roli transportującej, wpływają również na procesy przebudowy tkanki skórnej. Według Pickarta [6] proliferacja i proces różnicowania się komórek macierzystych skóry zależy od stężenia Cu^{2+} . Małe stężenia stymulują proliferację komórek, jednocześnie hamując ich różnicowanie. Tripeptyd GHK zwiększał proliferację komórek macierzystych, w przeciwieństwie do kompleksu GHK-Cu, który z kolei nasilał ich różnicowanie. Stymulacja proliferacji fibroblastów w przypadku tripeptydu GHK obserwuje się już przy stężeniu 10^{-12} M [6]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zarówno tripeptyd GHK, jak i GGH w stężeniu 10^{-7} i 10^{-9} M stymulują proces proliferacji ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF, odpowiedzialnych za syntezę składowych macierzy pozakomórkowej m.in. kolagenu.

Stwierdzono również, że dodatek miedzi do GGH nie wpływa na proces proliferacji. Wydaje się, że za zwiększenie proliferacji fibroblastów jest odpowiedzialna frakcja peptydowa, a nie dodatek Cu^{2+} . Skórna aplikacja GHK-Cu w postaci kremu silniej stymuluje fibroblasty do produkcji kolagenu niż kwas retinowy czy witamina C, a ponadto nie wykazuje właściwości drażniących [26]. Kosmetyki dostępne na polskim rynku nie zawierają aktywnej miedzi w postaci kompleksów GGH-Cu czy GHK-Cu. Jony miedzi występują jedynie w postaci komercyjnie dostępnych hydrolizatów białkowych, np. Oligolides Copper[®], które są produktem fermentacji białek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych na pożywce wzbogaconej o związki miedzi. Zastosowanie preparatu Oligolides Copper[®] w stężeniu 3% – podobnie jak GHK czy GGH – zwiększało proliferację ludzkich fibroblastów skóry.

Oprócz aktywności SOD, zbadano wpływ 1-nanomolowych roztworów GGH i GHK oraz ich kompleksów z miedzią (GGH-Cu i GHK-Cu) na aktywność GPx i GR. Peroksydaza glutationowa katalizuje reakcję między glutationem (GSH) a H_2O_2 : $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$. Powstający w wyniku tej reakcji GSSG jest redukowany przez GR [13, 14]. W pracy wykazano, że 1-nanomolowe stężenia badanych związków nie wpływają na aktywność GR, natomiast zaobserwowano wyraźne zmniejszenie aktywności GPx. Niedobór miedzi zmniejsza aktywność nie tylko SOD, ale również katalazy i GPx [16]. Długotrwała ekspozycja na Cu^{2+} prowadzi do zwiększenia aktywności GPx oraz Mn-SOD, natomiast nie wpływa na aktywność katalazy glutationowej i GR [27]. Komórki raka wątroby linii HAC600, które charakteryzują się gromadzeniem w obrębie cytoplazmy związków miedzi i dużym stężeniem metalotioneiny, wykazują dużą aktywność GPx [28]. Z badań Geetha i wsp. [29] wynika, że zwiększenie osocznego stężenia wolnej, niezwiązanej z ceruloprazminą, miedzi zwiększa peroksydację lipidów w komórkach raka wątrobowokomórkowego, a z kolei zwiększenie markerów stresu oksydacyjnego prowadzi do obniżenia w tkance wątrobowej aktywności GPx, SOD czy katalazy. Prawdopodobnie zwiększenie aktywności SOD może być odpowiedzialne za zmniejszenie aktywności GPx. Wydaje się, że wpływ miedzi na aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest tkankowo specyficzna. Miedź jest jednym z wielu elementów skomplikowanej sieci mechanizmów, które regulują procesy prooksydacyjne i antyoksydacyjne w komórkach.

Piśmiennictwo

1. Choi CM, Berson DS. Cosmeceuticals. *Semin Cutan Med Surg* 2006; 25: 163-8.
2. Sikora M. Pentapeptydy w recepturach kosmetycznych. *Kosmet Kosmetol* 2007; 3: 30-3.
3. Pickart L. Copperceuticals and the skin. *Cosmet Toilet* 2003; 24-8.

- Stepulak M. Kosmetyki oparte na peptydach – czyżby nowy sposób na walkę z efektami starzenia. Rynek Kosmetyków i Farmaceutyków 2007; 01, e-czasopismo.
- Deprez P. Oligopeptydy naśladujące działanie toksyny botulinowej (I). Med Estet Anti-Aging 2007; 2: 18-25.
- Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. J Biomater Sci Polym Ed 2008; 19: 969-88.
- Maquart FX, Pickart L, Laurent M, et al. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. FEBS Lett 1988; 238: 343-6.
- Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC. Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrixes. J Soc Biol 1999; 193: 423-8.
- Thomas CE. The influence of medium components on Cu²⁺-dependent oxidation of low-density lipoproteins and its sensitivity to superoxide dismutase. Biochim Biophys Acta 1992; 1128: 50-7.
- Arct J. Preparaty miedziowe w kosmetyce pielęgnacyjnej skóry. Derm Estet 2003; 2: 87-90.
- Kleszczewska E, Jabłońska-Trypuć A. Aktywność biologiczna miedzi i cynku oraz ich znaczenie w metabolizmie skóry. Med Estet Ant-Aging 2007; 3: 11-21.
- Mucha A, Cappanelli M, Szczepanik W, et al. Influence of the physiologically widespread substances on the oxidative activity of copper(II) complexes with sinefungin, a nucleoside antibiotic. J Inorg Biochem 2006; 100: 178-85.
- Gałecka E, Jacewicz R, Mrowicka M i wsp. Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. Pol Merk Lek 2008; 147: 266-8.
- Radwańska-Wala B, Buszman E, Druźba D. Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie chorób ośrodkowego układu nerwowego. Wiad Lek 2008; 1: 67-73.
- Frydrych A, Arct J, Kasiura K. Przenaskórkowy transport metali – korzyści i zagrożenia. Wiad Pol Tow Kosm 2005; 1: 14-8.
- Bureau I, Gueux E, Mazur A, et al. Female rats are protected against oxidative stress during copper deficiency. J Am Coll Nutr 2003; 22: 239-46.
- Bertinato J, Iskandar M, L'Abbé MR. Copper deficiency induces the upregulation of the copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase in weanling male rats. J Nutr 2003; 133: 28-31.
- Lynch SM, Colón W. Dominant role of copper in the kinetic stability of Cu/Zn superoxide dismutase. Biochem Biophys Res Commun 2006; 340: 457-61.
- Roughhead ZK, Johnson LK, Hunt JR. Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed varying concentrations of iron, zinc and copper. J Nutr 1999; 129: 1368-76.
- Mazurowska L, Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. J Cosmet Sci 2008; 59: 59-69.
- Almiñana N, Alsina MA, Reig F. New GHK hydrophobic derivatives: interaction with phospholipid bilayers. Colloids Surf B Biointerfaces 2007; 57: 243-9.
- Arul V, Gopinath D, Gomathi K, et al. Biotinylated GHK peptide incorporated collagenous matrix: a novel biomaterial for dermal wound healing in rats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 73: 383-91.
- Arul V, Kartha R, Jayakumar RA. A therapeutic approach for diabetic wound healing using biotinylated GHK incorporated collagen matrices. Life Sci 2007; 80: 275-84.
- Sander CS, Chang H, Salzmann S, et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol 2002; 118: 618-25.
- Pickart L. Skin remodeling copper peptides. Cosmet Med 2004; 2: 14-29.
- Pickart L. Copper peptides for tissue regeneration. Spec Chem 2002; 9: 29-31.
- Brouwer M, Brouwer TH. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Arch Biochem Biophys 1998; 351: 257-64.
- Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. J Biol Chem 1989; 264: 5598-605.
- Geetha A, Saranya P, Annie Jeyachristy S, et al. Relevance of non-ceruloplasmin copper to oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. Biol Trace Elem Res 2009 (artykuł przyjęty do druku).