

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА GLY-HIS-LYS**Чернышёва О.И., Бобынцев И.И.***ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Курск, e-mail: bobig@mail.ru*

В обзоре представлены систематизированные данные о биологических эффектах трипептида Gly-His-Lys, ранее известного как фактор роста клеток печени, и его комплекса с медью (Gly-His-Lys-Cu). Пептид усиливает процессы заживления кожных ран за счет стимуляции синтеза коллагена фибробластами, накопления межклеточного вещества соединительной ткани, роста новых кровеносных сосудов, повышения уровня антиоксидантных ферментов, снижения уровня провоспалительного цитокина ФНО, привлечения в очаг воспаления иммунных и эндотелиальных клеток. Комплекс Gly-His-Lys-Cu способен также регулировать ремоделирование кожи. При переломах и различных видах токсической гепатопатии оказывает иммуностимулирующее и репаративное влияние трипептида. Сделан вывод о высокой активности пептида и необходимости поиска его новых физиологических эффектов.

Ключевые слова: пептид Gly-His-Lys, регенерация, воспаление, антиоксиданты, иммунотропное действие

BIOLOGICAL EFFECTS OF THE TRIPEPTIDE GLY-HIS-LYS**Chernysheva O.I., Bobyntsev I.I.***Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: bobig@mail.ru*

This review presents systematized data about the biological effects of the tripeptide Gly-His-Lys, previously known as the hepatic cell growth factor and its complex with copper (Gly-His-Lys-Cu). The peptide enhances the healing process of cutaneous wounds by stimulating the synthesis of collagen by fibroblasts, extracellular accumulation of the substance of the connective tissue, growth of new blood vessels, increased level of antioxidant enzymes, reduction of the proinflammatory cytokine TNF which attracts immune and endothelial cells into the focus of inflammation. The complex Gly-His-Lys-Cu is also able to adjust the remodeling of the skin. The peptide has immunostimulating and reparative influence on fractures and various kinds of toxic hepatopathy. The Gly-His-Lys was proved to be highly active peptide and its new physiological effects need to be found.

Keywords: peptide Gly-His-Lys, regeneration, inflammation, antioxidants, immunotropic action

Одним из актуальных вопросов в современной науке является изучение физиологических эффектов регуляторных пептидов, к числу которых относится Gly-His-Lys (GHL). Человеческий пептид GHL был выделен в 1973 году как активное вещество в плазме человека, которое активизировало в старой человеческой ткани печени синтез белков, характерный для молодой ткани [14], поэтому в некоторых ранних работах его называли «печеночным фактором роста». Корригирующий эффект пептида в отношении функций печени установлен и в условиях хронической тетрахлорметановой гепатопатии [4]. В плазме человека GHL присутствует в количестве около 200 мкг/л у мужчин в возрасте 20–25 лет, но снижается до 80 мкг/л к возрасту 60–80 лет [14].

Последующие исследования установили, что это вещество является трипептидом с аминокислотной последовательностью, глицил-L-гистидил-L-лизин с сильным сродством к меди, с образованием комплекса Gly-His-Lys – Cu (GHL-Cu). Поскольку GHL-Cu способствует росту клеток, было предложено, что GHL действует путем предоставления меди, необходимой для клеточных функций [15].

В дальнейшем внимание исследователей сосредоточилось на его ранозаживляющих

свойствах. Полученные данные во многом позволили прояснить механизм обновляющего и ремоделирующего действия трипептида. В частности, удалось установить, что он стимулирует синтез ключевых белков кожи коллагена и эластина, увеличивает синтез гликозаминогликанов внеклеточного матрикса дермы, а также модулирует структурную перестройку кожи, влияя как на активность протеолитических ферментов, так и их ингибиторов [21].

Известен стимулирующий эффект GHL на синтез коллагена фибробластами *in vitro*, который начинал проявляться при концентрациях пептида 10^{-12} и 10^{-11} м, достигал максимальных значений при 10^{-9} м и не зависел от количества клеток в культуре. Можно предположить, что GHL освобождается из коллагена под влиянием протеаз, поскольку такая же аминокислотная последовательность присутствует в α_2 -цепи коллагена I типа. Также пептид дозозависимо стимулировал синтез сульфатированных гликозаминогликанов – внеклеточного дерматансульфата и связанного с клеточным моносомом гепарансульфата [7]. При высоких концентрациях пептида скорость их синтеза возвращалась до уровня контроля. При этом не было отмечено стимулирующего влияния GHL на синтез гиалуроновой

кислоты. При этом пептид повышает накопление межклеточного вещества соединительной ткани и тем самым ускоряет ее образование [25]. Вероятно, что все эти эффекты, оказывающие стимулирующее влияние на рост соединительной ткани, объясняют ускоренное заживление ран и язв под влиянием GHF.

В экспериментах на крысах также показано стимулирующее действие пептида на регенерацию кожи при внутрибрюшинном введении в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг. Репаративное действие GHF подтверждалось морфологическими исследованиями раневых срезов. По сравнению с контрольной группой животных, у крыс, получавших пептид в дозе 0,5 мкг/кг, отмечается уменьшение отека в области раны, выраженное снижение плотности клеточного инфильтрата за счет меньшего количества лимфоцитов и макрофагов, а также преобладание зрелых фибробластов над незрелыми, что свидетельствует о более благоприятном течении процессов регенерации под влиянием пептида. При этом пептид оказывал преимущественно супрессивное влияние на кислородзависимые механизмы защиты нейтрофилов крови, снижая их функциональный резерв. Важно отметить, что проявление репаративного эффекта GHF зависит от его дозы. Тот факт, что повышение дозы GHF не только не усиливало эффекты пептида, но даже ослабляло их, может быть следствием механизма обратной отрицательной связи. Результатом этого может быть существенное снижение экспрессии рецепторов сигнальных молекул при длительном воздействии их агонистов. Учитывая тот факт, что по большинству показателей выраженной иммуностимулирующей активности GHF в условиях кожных ран не выявлено, можно предположить, что его репаративные эффекты реализуются не через иммунную систему и, вероятно, связаны с непосредственным действием пептида на клетки кожи и проявляются преимущественно в малых дозах (0,5 и 1,5 мкг/кг). Следует отметить, что аналогичная GHF последовательность аминокислот обнаружена в молекуле коллагена. В связи с этим сделано предположение о возможности образования пептида под влиянием протеаз в месте повреждения и стимуляции в нем восстановительных процессов. Подобный механизм действия характерен для пептидов, образующихся в результате частичного протеолиза соответствующих белков и осуществляющих аутокринную или паракринную регуляцию [2].

Необходимо отметить, что не только пептид GHF, но и комбинация составляющих его аминокислот (глицин + гистидин + лизин), стимулировали заживление кожных ран. При введении аминокислот по

отдельности было установлено, что глицин и гистидин не влияли на заживление кожных ран, тогда как введение лизина повышало регенерацию. Репаративное действие комбинации аминокислот и лизина подтверждалось морфологическими исследованиями раневых срезов. По сравнению с контрольной группой животных, у крыс, получавших комбинацию аминокислот и лизин, отмечается уменьшение отека в области раны, выражено снижение плотности клеточного инфильтрата за счет меньшего количества лимфоцитов и макрофагов, а так же преобладание зрелых фибробластов над незрелыми, что свидетельствует о более благоприятном течении процессов регенерации под влиянием аминокислот и лизина. Полученные данные показывают, что эффекты GHF могут быть связаны с лизином, образующимся в результате возможного протеолиза пептида [1].

Известно, что в кожной ране GHF-Cu одновременно усиливает синтез коллагена I типа и распад старого коллагена [22]. Также было установлено, что GHF-Cu регулирует перестройку структуры кожи (ее ремоделирование), активируя металлопротеиназы – ферменты, отвечающие за разрушение компонентов внеклеточного матрикса дермы. Кроме того, GHF-Cu не только модулирует активность различных дермальных металлопротеиназ, но и меняет активность антипротеиназ. Ускорению заживления ран может способствовать и способность GHF-Cu привлекать в область ранения иммунные и эндотелиальные клетки [17].

Введение GHF-Cu в область раны стимулирует синтез коллагена и гликозаминогликанов (дерматансульфата и хондроитинсульфата) и повышает уровня двух небольших протеогликанов – биглюкана и декорина, который выполняет функцию регулировщика сборки молекул коллагена, обеспечивая формирование однородных упругих фибрилл. Способность GHF-Cu повышать продукцию декорина была подтверждена и в экспериментах *in vitro* на культуре фибробластов [21].

В экспериментах на животных было подтверждено влияние GHF-Cu на заживление разных видов ранений и повреждений кожи. Например, у кроликов GHF-Cu ускорял заживление ран и стимулировал рост новых кровеносных сосудов. В сочетании со светом гелийнеонового лазера GHF-Cu также повышал уровень антиоксидантных ферментов в коже [19].

Выраженным ранозаживляющим эффектом также обладает комплекс GHF-Cu с биотином, встроенным в коллагеновые листы. Такие листы ускоряли заживление

ран у крыс как по сравнению с контрольными (необработанными) ранами, так и ранами, которые были покрыты коллагеновыми листами без GHЛ-Cu. При этом пептид также вызывал увеличение пролиферации клеток и повышение уровня антиоксидантных ферментов [23].

Важно, что GHЛ значительно улучшает заживление осложненных ран, например, диабетических язв у крыс: здесь также было отмечено повышение уровня антиоксидантов (глутатиона и аскорбиновой кислоты) и синтеза коллагена [15]. GHЛ-Cu также ускорял заживление ишемических ран у крыс, в которых наблюдалось снижение уровня провоспалительного цитокина ФНО [9].

Эксперименты на животных также показали, что GHЛ-Cu способен значительно улучшать состояние кожи, обеспечивая при этом быстрое заживление повреждений, снижение выраженности воспалительной реакции, улучшение кровоснабжения и повышение уровня антиоксидантов. Данные свойства позволили рекомендовать его для ухода за кожей до и после пластических операций, особенно у людей пожилого возраста.

В современной косметологии биологически активные пептиды стали весьма популярными ингредиентами, однако далеко не всегда имеются научные обоснования их эффективности. Важно отметить, что некоторые пептиды не могут проникать через неповрежденный роговой слой кожи и остаются на ее поверхности, тогда как GHЛ-Cu проникает через барьерные структуры рогового слоя. В исследовании, проведенном на 20 женщинах, ежедневно в течение одного месяца на кожу бедра наносили крем, содержащий витамин С или ретиноевую кислоту, либо GHЛ-Cu. Уровень коллагена определяли иммуногистологическим анализом биопсийного материала. По результатам исследования оказалось, что в коже, обработанной препаратом с GHЛ-Cu, уровень коллагена увеличивался на 70% по сравнению с исходным показателем. Для витамина С и ретиноевой кислоты увеличение составило 50 и 40% соответственно [6].

В ходе самых первых экспериментов по изучению эффектов трипептида было отмечено, что по периферии ран, обработанных GHЛ-Cu, появляются увеличенные волосные фолликулы. Тогда это было лишь интересным наблюдением, однако в свете новых знаний о стволовых клетках кожи оно становится не просто любопытным фактом, т.к. в настоящее время известно, что фолликулы волос являются одним из источников стволовых клеток, участвующих в восстановлении кожи [24].

Способность GHЛ-Cu уменьшать симптомы фотостарения, ускорять заживление ран и улучшать рост волос в очередной раз свидетельствует о его важной роли в процессе обновления кожи и согласуется с данными о том, что GHЛ способен влиять на стволовые клетки кожи [16]. На многослойных эквивалентах кожи установлено, что GHЛ-Cu в концентрации $0,1-10 \times 10^{-6}$ М повышает пролиферативный потенциал базальных кератиноцитов и экспрессию специфических маркеров стволовых клеток кожи – интегринов и белка p63. При этом базальные кератиноциты приобретали более кубовидную форму. По мнению авторов исследования, эти изменения в клетках свидетельствуют о том, что они становятся «более стволовыми», т.е. большей степени способными дифференцироваться в клетки, нужные для восстановления кожи [12]. Поэтому не исключено, что способность трипептида GHЛ улучшать состояние стареющей кожи во многом объясняется восстановлением ее «золотого запаса» – стволовых клеток. Благодаря своей способности переносить ионы меди GHЛ может снабжать ими зависимые от меди антиоксидантные ферменты, например, СОД. Антиоксидантная и противовоспалительная активность GHЛ делает его перспективным ингредиентом в солнцезащитной косметике – подавляя воспаление и уменьшая окислительный стресс, этот трипептид может защищать кожу от УФ-индуцированного старения [10].

Одним из известных механизмов омолаживающего и репаративного воздействия GHЛ является его влияние на восстановление функционального состояния поврежденных клеток кожи, в частности, фибробластов [16]. Это свойство было обнаружено в эксперименте на человеческих фибробластах, часть из которых была подвергнута радиоактивному излучению (5000 рад). Добавление в культуру клеток GHЛ-Cu стимулировало размножение облученных клеток, синтез белков и факторов роста. В результате облученные клетки не только не отставали в росте от нормальных клеток, но даже обгоняли их. Облученные клетки, к которым не добавляли GHЛ, росли медленнее нормальных клеток и вырабатывали меньше ростовых факторов [22].

Важным свойством пептида является его способность к синергичному с другими пептидами влиянию на ряд процессов в организме. Так, в условиях экспериментального перелома бедренной кости у крыс сочетанное внутрибрюшинное в течение 10 дней использование GHЛ с даларгином и тимогеном сопровождалось повышением антиоксидантной активности в виде

снижения уровня малонового диальдегида и повышения активности каталазы в крови. Пептиды обладали синергичным антиоксидантным и репаративным действием, поскольку при комбинированном (парном) введении препаратов наблюдалось существенное усиление антиоксидантного (активность каталазы) и репаративного эффектов по сравнению с использованием препаратов по отдельности. Более выраженные репаративные изменения были выявлены в группе комбинированного введения пептидов GHЛ + даларгин, что подтверждалось гистологическими и рентгенологическими исследованиями. У животных этой группы через 10 дней линия перелома практически не прослеживалась [5].

Синергичные с другими пептидами эффекты GHЛ в условиях экспериментальных переломов у крыс были выявлены в отношении функциональной активности нейтрофилов крови. Так, внутрибрюшинное в течение 10 дней введение в эквивалентных дозах пептидов GHЛ, даларгина и тимогена сопровождалось стимулирующим действием на функцию нейтрофилов крови и репаративные процессы в кости. При комбинированном введении препаратов наблюдалась более выраженная активация функции нейтрофилов и репаративной регенерации костей по сравнению с использованием препаратов по отдельности. Комбинация GHЛ + даларгин корректировала как поглотительную стадию фагоцитоза нейтрофилов, так и их кислородзависимую активность, что сопровождалось выраженной активацией восстановительных процессов [3].

К настоящему времени наряду с репаративным действием пептида на кожу, кости и гепатоциты установлен целый ряд новых биологических эффектов. В частности, в условиях хронической тетрахлорметановой гепатопатии установлен корректирующий эффект пептида в отношении ряда показателей функционального состояния иммунной системы [4]. Отдельный интерес представляет исследование влияния 1309 биологически активных веществ на уровень экспрессии генов, способствующих метастазированию рака толстого кишечника. Из всего массива протестированных соединений только два – GHЛ и растительный алкалоид секуринин – оказались способными уменьшать экспрессию данных генов и уменьшать риск метастазирования. Оба вещества были активны в очень низких концентрациях – 1×10^{-6} М для GHЛ и 18×10^{-6} М для секурина [11].

Показана способность GHЛ подавлять токсичные продукты перекисного окисления липидов – жирные кислоты, которые

играют важную роль в патогенез нескольких возрастных патологий, включая болезнь Альцгеймера, нейропатии и ретинопатии. Пептид также ослаблял действие акролеина – токсичного продукта перекисного окисления липидов, участвующего в развитии многих возрастных дегенеративных заболеваний, что предполагает возможность его использования для профилактики некоторых форм возрастной патологии нервной системы, в том числе болезни Альцгеймера [17, 18].

Важно отметить, что существует доказательство увеличения продукции нейротрофических факторов под влиянием GHЛ. В частности, GHЛ стимулировал разрастание культивируемых нервов [13, 20]. В нервных корешках, помещенных в коллагеновую трубку, пропитанную GHЛ, повышалась выработка факторов роста нервов и нейротрофинов NT-3 и NT-4, увеличивалась миграция клеток в коллагеновой трубке и ускорялась регенерация нервных волокон. При этом увеличивались количество аксонов и пролиферация шванновских клеток [7].

Таким образом, трипептид GHЛ обладает достаточно широким спектром биологической активности, включающим в себя влияние на процессы регенерации ткани, антиоксидантные, иммуностропные, противовоспалительные и нейротропные эффекты. Вышеперечисленные эффекты пептида свидетельствуют о его полифункциональности, которая хорошо известна для коротких регуляторных пептидов. Особо актуальным и перспективным представляется изучение влияния пептида на процессы регенерации и трофики в нервной ткани при ее возрастной патологии. При этом следует отметить одно достаточно важное обстоятельство. Известно, что многие короткие регуляторные пептиды обладают и высокой нейротропной активностью, оказывая значительное влияние на высшие функции мозга. Поэтому, учитывая перспективность клинического применения препаратов на основе GHЛ, представляется необходимым проведение экспериментальных доклинических исследований в данном направлении.

Список литературы

1. Влияние аминокислот, составляющих пептид глицил-гистидил-лизин, на регенерацию кожных ран и функцию нейтрофилов / А.А. Курцева, М.Ю. Смахтин, А.В. Иванов, А.В. Беседин // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2008. – № 3. – С. 5–10.
2. Курцева А.А. Репаративная и иммуностропная активность пептида gly-his-lys в условиях кожных ран // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2008. – № 1. – С. 36–40.
3. Применение регуляторных пептидов: тимогена, даларгина, глицил-гистидил-лизина и их комбинаций для коррекции нейтрофильного звена антиинфекционного иммунн-тета при переломе бедренной кости / В.Ю. Чердаков, М.Ю. Смахтин,

- Г.М. Дубровин, И.И. Бобынцев // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2012. – № 2. – С. 40–43.
4. Смахтин М.Ю. Сравнительная характеристика гепатоцеллюлярных и иммуноотропных эффектов регуляторных пептидов в условиях хронической гепатопатии // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2008. – № 4. – С. 16–22.
5. Чердаков В.Ю. Синергичное антиоксидантное и репаративное действие тимогена, да-ларгина и пептида gly-his-lys при переломе трубчатых костей // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2010. – № 10. – С.15–20.
6. Abdulghani A.A., Sherr S., Shirin S., Solodkina G., Tapia E.M., Gottlieb A.B. Effects of topical creams containing vitamin C, a copper-binding peptide cream and melatonin compared with tretinoin on the ultrastructure of normal skin – A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *Disease Manag Clin Outcomes*. 1998. – Vol. 1. – P. 136–141.
7. Ahmed M.R., Basha S.H., Gopinath D., Muthusamy R., Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *Journal of the Peripheral Nervous System*. – 2005. – Vol. 10. – №1. – P. 17–30.
8. Beretta G, Artali R, Regazzoni L, Panigati M, Facino RM. Glycyl-histidyl-lysine (GHK) is a quencher of α,β -4-hydroxy-trans-2-nonenal: a comparison with carnosine. Insights into the mechanism of reaction by electrospray ionization mass spectrometry, 1H NMR, and computational techniques. *Chemical Research in Toxicology*. 2007. – Vol. 20. – № 9. – P. 1309–1315.
9. Canapp SO Jr., Farese J.P., Schultz G.S., Gowda S., Ishak A.M., Swaim S.F., Vangilder J., Lee-Ambrose L., Martin F.G. The effect of topical tripeptide-copper complex on healing of ischemic open wounds. *Vet Surg*. – 2003. – Vol. 32. – № 6. – P. 515–523.
10. Gorouhi F., Maibach H.I. Role of topical peptides in preventing and treating aged skin. *Int. J. Cosm. Sci.*, 2009. – №. 31. – P. 327–345.
11. Hong Y., Downey T., Eu K.W., Koh P.K., Cheah P.Y. A 'metastasis-prone' signature for early-stage mismatch-repair proficient sporadic colorectal cancer patients and its implications for possible therapeutics. *Clin Exp Metastasis*. 2010. February 9. – P.73.
12. Kang Y.A., Choi H.R., Na J.I., Huh C.H., Kim M.J., Youn S.W., Kim K.H., Park K.C. Copper-GHK increases integrin expression and p63 positivity by keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. – 2009. – Vol. 301. – № 4. – P. 301–306.
13. Lindner G., Grosse G., Halle W., Henklein P. The effect of a synthetic tripeptide nervous tissue cultured in vitro. *Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung*. – 1979. – Vol. 93. – №5. – P. 820–828.
14. Pickart L. A tripeptide in human serum that promotes the growth of hepatoma cells and the survival of normal hepatocytes. San Francisco, Calif, USA: University of California; 1973. Ph.D. thesis. P. 143.
15. Pickart L., Freedman J.H., Loker W.J. Growth-modulating plasma tripeptide may function by facilitating copper uptake into cells. *Nature*. – 1980. – Vol. 288. – № 5792. – P. 715–717.
16. Pickart L. The human tripeptide GHK (Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine), the copper switch and the treatment of the degenerative conditions of aging. In *Anti-Aging Therapeutics* Volume 11, Ed. By Klatz R. and Goldman R. Chicago, IL, USA: American Academy of Medicine, 2009. – P. 301–302.
17. Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2008. – Vol. 19. – № 8. – P. 969–988.
18. Pickart L., Pickart F. Society for the Advancement of Wound Care and the Wound Healing Society. Dallas, Tex, USA: Wound Repair and Regeneration. A possible mechanism whereby skin remodeling may suppress cancer metastasis genes. – 2011. – P. 8–62.
19. Pilgeram, L. «Control of fibrinogen biosynthesis; role of FFA/Albumin Ratio». *Cardiovasc Eng*. – 2010. – Vol. 10. – № 2. – P. 78–83.
20. Sensenbrenner M., Jaros G.G., Moonen G., Meyer B.J. Effect of conditioned media on nerve cell differentiation. *Experientia*. – 1980. – Vol. 36. – № 6. – P. 660–662.
21. Siméon A., Wegrowski Y., Bontemps Y., Maquart F.X. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-Histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol*. – 2000. – Vol. 115. – № 6. – P. 962–968.
22. Siméon A., Emonard H., Hornebeck W., Maquart F.X. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. – 2000. – Vol. 22. – № 67. – P. 2257–2265.
23. Schlesinger D.H., Pickart L., Thaler M.M. «Growth-modulating serum tripeptide is glycyl-histidyl-lysine». *Cellular and Molecular Life Sci*. – 1977. – Vol. 33. – № 3. – P. 324–325.
24. Uno H., Kurata S. Chemical agents and peptides affect hair growth. *J Invest Dermatol*. – 1993. – Vol. 101. – № 1. – P. 143–147.
25. Wegrowski Y., Maquart F.X., Borel J.P. Stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *Life Sci*. – 1992. – Vol. 51. – № 13. – P. 1049–1056.