

Hadí jed v kosmetice

Polina Tikhomolova

Bakalářská práce
202X



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Polina Tikhomolova
Osobní číslo: T22116
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Hadí jed v kosmetice

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
Zaměřte se na výskyt a využití hadího jedu, s akcentem na jeho využití v kosmetice.
Cílem práce je kritické zhodnocení účinků hadího jedu s ohledem na jeho kosmetické aplikace.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Vědecké články z databází *Web of Science*, *Scopus* atd; databáze elektronických knih.
[2] RUSMIL, Muhamad Rusdi Ahmad et al. The Use of Venom and Venom-Derived Products in Medicine and Cosmetics, DOI: <https://doi.org/10.21336/imjm.v17i1.1038>.
[3] WAHEED, Humera et al. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics, *Current Medical Chemistry*, Volume 24, Number 17, 2017, pp. 1874-1891(18)
[4] OHSAKA, Akira et al. Animal, Plant, and Microbial Toxins: Volume 2 Chemistry, Pharmacology, and Immunology. Springer; 2nd ed. 2012, 592 p., ISBN: 978-1-4684-0889-8. DOI: **10.2174/0929867324666170605091546**.
[5] J.R. Almeida, L.M. Resende, R.K. Watanabe, V.C. Carregari, S. Huancahuire-Vega, C.A. da S. Caldeira, A. Coutinho-Neto, A.M. Soares, N. Vale, P.A. de C. Gomes, S. Marangoni, L. de A. Calderon and S.L. Da Silva*. Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools and Therapeutic Agents. *Current Medicinal Chemistry*. Volume 24, Issue 30, 2017, p. 3254–3282. DOI: 10.2174/0929867323666161028155611.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavlína Egner, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá využitím hadího jedu v kosmetickém průmyslu, se zaměřením na syntetický peptid Syn-Ake, který napodobuje účinek Waglerinu 1, pocházející ze druhu hada *Tropidolaemus wagleri* a působí jako reverzibilní antagonist nikotinových acetylcholinových receptorů. Tento mechanismus umožňuje inhibici svalových kontrakcí, což vede k redukci mimických vrásek a zlepšení elasticity pokožky. Práce analyzuje chemické složení hadího jedu, mechanismy účinku a jeho interakce s matrixovými metaloproteinázami a sirtuin deacetylázou 1. Výsledky ukazují, že Syn-Ake má antioxidační vlastnosti a přispívá k regeneraci pokožky, čímž zpomaluje proces stárnutí. Syn-Ake tak představuje inovativní a bezpečnou alternativu k botulotoxinu v oblasti anti-aging kosmetiky.

Klíčová slova: hadí jed, Syn-Ake, anti-aging, kosmetika.

ABSTRACT

This thesis is focused on the use of snake venom in the cosmetic industry, focusing on the synthetic peptide Syn-Ake. Syn-Ake mimics the action of Waglerin 1 from the viper *Tropidolaemus wagleri* and acts as a reversible antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (mnAChR). This mechanism allows inhibition of muscle contractions, leading to a reduction of mimic wrinkles and improved skin elasticity. This work analyzes the chemical composition of snake venom, its mechanisms of action and its interactions with matrix metalloproteinases (MMPs) and sirtuin deacetylase 1 (SIRT1). The results show that Syn-Ake has antioxidant properties and contributes to skin regeneration, thereby slowing the aging process. Syn-Ake thus represents an innovative and safe alternative to botulinum toxin in the field of anti-aging cosmetics.

Keywords: snake venom, syn-ake, anti-aging, cosmetic.

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce, Ing. Pavlíně Egner, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady a podporu při zpracování této práce. Dále bych chtěla vyjádřit vděk všem vyučujícím našeho oboru za jejich pomoc, trpělivost a loajalitu. Také bych ráda poděkovala svým přátelům Marii Nikiforové a Kristině Sologub, které mi poskytly cennou podporu v těžkých obdobích mého života.

OBSAH

ÚVOD.....	11
1. HISTORIE VYUŽITÍ HADÍHO JEDU	12
1.1 AKTIVNÍ SLOŽKY HADÍHO JEDU	14
1.1.1 Krotamin	14
1.1.2 Sarafotoxiny	15
1.1.3 Natriuretické peptidy	16
1.1.4 Peptidy zesilující účinek bradykininu	17
1.1.5 Dezintegriny	18
1.1.6 Three-finger toxin	20
1.1.7 Fosfolipáza A2	22
1.1.8 L-aminooxidáza	23
1.1.9 Metaloproteáza	23
1.1.10 Serinové proteázy	24
2. HADÍ JED V KOSMETICE	25
2.1 MECHANISMUS PŮSOBNÍ SYN-AKU	26
2.1.1 Analog botoxu	26
2.1.2 Interakce Syn-Aku	27
2.1.3 Antioxidační aktivita	30
2.2 TESTY ÚČINKU SYN-AKE	31
2.2.1 <i>In vivo</i> test	31
2.2.2 Přínosy lokální péče v oblasti obličejových linií a vrásek	34
2.3 TOXICITA SYN-AKU	34
2.3.1 Cytotoxicita	35
2.3.2 Genotoxicita	35
2.4 SYNTÉZA PEPTIDU SYN-AKE	36
2.4.1 Syntéza peptidů na pevné fázi	36
2.4.2 Syntéza peptidů v kapalně fázi	37
2.4.3 Další metody přípravy Syn-Ake	39
2.5 PRAKTICKÉ UPLATNĚNÍ SYN-AKE V KOSMETICE	39
2.5.1 Vivaco	39
2.5.2 Diet Esthetic Laboratory	43
2.5.3 Rodial	44
2.5.4 Limoni	45
2.5.5 Farm Stay	47
ZÁVĚR	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
SEZNAM OBRÁZKŮ	58

ÚVOD

Hadí jed je jedním z nejzajímavějších biologických materiálů, který lidstvo zná a po staletí využívá. Od starověkého Egypta, přes tradiční indickou medicínu až po moderní farmaceutický a kosmetický průmysl, představuje hadí jed cenný zdroj biologicky aktivních látek s širokým spektrem účinků. Hadí jed obsahuje komplexní směs proteinů, peptidů, enzymů a dalších bioaktivních molekul, které ovlivňují nervový, kardiovaskulární a imunitní systém. V posledních desetiletích vědecký výzkum ukázal, že některé složky hadího jedu mají schopnost inhibovat svalové kontrakce, stimulovat buněčnou regeneraci, působit protizánětlivě a antioxidačně. Tyto vlastnosti se ukázaly jako mimořádně cenné v kosmetickém průmyslu, zejména v oblasti anti-aging.

SynAke, syntetický peptid inspirovaný hadím jedem Waglerin 1 ze zmije druhu *Tropidolaemus wagleri*, je jedním z nejznámějších příkladů využití hadího jedu v kosmetice. Tento tripeptid působí jako reverzibilní antagonist nikotinových acetylcholinových receptorů (mnAChR), čímž dočasně inhibuje svalové kontrakce a vede ke snížení výskytu mimických vrásek. Mechanismus účinku Syn-Ake je podobný účinku botulotoxinu, avšak s nižší toxicitou a lepší snášenlivostí pro pokožku. Kromě inhibice svalových kontrakcí Syn-Ake také podporuje regeneraci kožních buněk, chrání pokožku před oxidačním stresem a pomáhá zlepšovat její celkovou elasticitu.

Vědecké studie prokázaly, že Syn-Ake účinně interaguje s matrixovými metaloproteinázami (MMP) a sirtuin deacetylázou 1 (SIRT1), které hrají klíčovou roli v procesech stárnutí a obnovy kožní tkáně. Syn-Ake inhibuje degradaci kolagenu a podporuje syntézu nových strukturálních proteinů, což přispívá k lepší pevnosti a pružnosti pokožky. Kromě toho má Syn-Ake antioxidační vlastnosti, které chrání pokožku před poškozením způsobeným volnými radikály a UV zářením.

Tato práce se zaměřuje na detailní analýzu chemického složení hadího jedu, mechanismů jeho působení a možností jeho využití v kosmetických produktech. Hlavním cílem je, na základě dostupných vědeckých studií a experimentálních dat, zhodnotit účinnost Syn-Ake v boji proti vráskám a stárnutí pleti. Práce poskytuje ucelený přehled o složení hadího jedu, jeho biologických účincích a potenciálu pro další inovace v oblasti kosmetiky.

1. HISTORIE VYUŽITÍ HADÍHO JEDU

Hadi (Serpentes) představují skupinu plazů, která se vyvinula v rámci složitého ekologického a evolučního procesu. Někteří jedinci z této skupiny mají ke své obraně či pro lov potravy ve svém těle obsažen i jed. Je zajímavé, že i přes dlouhý evoluční vývoj existuje jedovatých hadů pouze přibližně 270 z celkového počtu zhruba 2500 popsanych druhů. Tento malý podíl ukazuje na diverzitu evolučních strategií v rámci hadích populací, kde si většina druhů vyvinula alternativní mechanismy přežití, jako jsou např. kamufláž nebo rychlé reflexy. V České republice se např. vyskytuje pouze jeden z jedovatých druhů, a to zmije obecná [2],[3].

Co se týče hadího jedu, rozlišují se tři typy jeho působení, a to především z pohledu neurotoxicity, hemotoxicity a cytotoxicity. Svými hemotoxickými a cytotoxickými účinky je známá především čeleď zmijovitých (Viperidae), kde se řadí chřestýši, mředenci a vakovlci. Čeleď Elapidae, kde patří i kobry, korálovky, koráloví hadi, krabi a mamby, je zase známá svými neurotoxickými účinky, které ve většině případů způsobují paralýzu převážně nervového systému. Podle Caswellovy studie [1] vedou patologické účinky neurotoxicity k respiračnímu selhání a nervosvalové paralýze tím, že blokují nervosvalový přenos a tím dojde k méně lokalizovanému poškození tkání. Patologický účinek hemotoxicity zase ovlivňuje krevní cévy a složky kaskády srážení krve, což způsobuje problémy s krvácením, jako je hypotenze nebo systémové krvácení, poškození tkání a cév v místě kousnutí, lýzu červených krvinek a poruchy srážlivosti krve [2],[3].

Od starověku se lidé hadů nejen báli a uctívali je, ale také se snažili najít využití pro látku, která se z hadích žláz vylučuje [4]. Vědci se domnívají, že staří Egypťané byli jedni z prvních, kteří systematizovali znalosti o jedovatých hadích uštknutích a jejich léčbě. Poměrně podrobné informace o jedovatých hadech, jejich uštknutích a způsobech léčby otravy lidí hadím jedem jsou obsaženy v tzv. brooklynských papyrech, datovaných do let 664–332 př. n. l. [5]. Starověká Indie byla zase centrem studia bylin a jedů a tamní hinduistické komunity jako první začaly používat hadí jed v medicíně. Bylo známo, že hadí jed je ve velmi nízké dávce silným stimulantem. Z hadích jedů se připravovaly důležité léky účinné při moru, horečce, kómatu nebo tuberkulóze [4].

Ve středověku se začaly formovat moderní představy o toxinologii, tj. vědě studující rostlinné a živočišné toxiny. Základy moderní toxikologie položil Paracelsus (Philip Aureol Theophrastus Bombast von Hohenheim; 1493—1541), který dokázal, že jed je chemická

látka s určitou strukturou, na níž závisí její toxicita. Paracelsus používal ve své lékařské praxi výtažky z hadího jedu, popsal metody jeho extrakce a důrazně doporučoval používat hadí šupiny při přípravě léčivých přípravků. Zároveň byl schopen hadí jed získávat v jeho čisté formě [4].

Intenzivní vědecké studium biochemie hadího jedu začalo až ve 30. letech 20. století [6]. Podle databáze PubMed, do dnešního dne bylo na téma hadích jedů publikováno přibližně 500 vědeckých prací ročně [4].

S tím, jak se začalo formovat studium jedů, začalo se formovat i vědecké zdůvodnění léčebného využití hadích jedů. Pokusy o vytvoření léčivých přípravků na bázi hadích jedů, které začaly již ve starověku, byly korunovány úspěchem až ve 20. století [4].

Moderní medicína disponuje velmi širokou škálou léků vyrobených právě na bázi hadího jedu. V tradičním pojetí jsou léky z hadího jedu různé a k dostání jako analgetické masti na klouby a další zevní aplikace, ale také i jako kosmetické přípravky (např. krémy na obličej s hadím jedem, masky apod.) [7], [8].

Hadí jedy jsou přírodními zdroji biologicky aktivních molekul schopných selektivně a specificky působit na různé buněčné cíle a modulovat jejich fyziologické funkce. Tyto směsi látek, které se skládají především z proteinů a peptidů, poskytují široké a náročné možnosti a rozmanité molekulární architektury pro návrh a vývoj nástrojů a látek vědeckého a terapeutického zájmu. Mezi těmito složkami hrají peptidy a malé proteiny v mnoha fyziologických procesech různorodou roli a uplatňují širokou škálu svých farmakologických účinků, jako jsou účinky antimikrobiální, antihypertenzní, analgetické, protinádorové a další. Farmaceutický a kosmetický průmysl rozpoznal obrovský potenciál těchto privilegovaných struktur a považuje je za slibnou alternativu moderních léčiv. Řada přírodních nebo syntetických peptidů z hadích jedů již našla preklinické nebo klinické využití při léčbě bolesti, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění a stárnutí kůže. Známým příkladem je kaptopril, jehož přírodní peptidový prekurzor byl izolován z jedu hada *Bothrops jararaca*. Jedná se o lék na bázi peptidu, který inhibuje angiotenzin, tj. konvertující enzym, což vyvolává antihypertenzní účinek [7],[9],[10].

Také jedna ze složek hadího jedu, konkrétně jeho syntetický analog, se používá v kosmetologii k minimalizaci svalových kontrakcí, a tím pádem k redukci vrásek [10], [11].

1.1 Aktivní složky hadího jedu

Aktivní složky hadího jedu mohou mít na lidský organismus různé účinky. Jedná se především o účinky neurotoxické, hemotoxické a cytotoxické. Tyto složky nejsou jenom klíčové pro obranu samotného hada, ale v poslední době se stávají předmětem intenzivního vědeckého výzkumu, který může vést k novým aplikacím, především v oblasti medicíny.

1.1.1 Krotamin

Krotamin je neenzymatický myotoxin, který se nachází v jedech hadů rodu *Crotalus*. Poprvé byl izolován v roce 1947 u druhu *Crotalus durissus terrificus*, tedy brazilského chřestýše, a následně byl identifikován u dalších druhů, jako jsou *C. adamanteus*, *C. durissus*, *C. d. cumanensis*, *C. d. ruruima*, *C. horridus*, *C. oreganus concolor*, *C. o. helleri* a *C. viridis viridis*. Krotamin je tedy krátký bazický polypeptidový myotoxin (SBPM - Small Basic Polypeptide Myotoxins) o molekulové hmotnosti 4800 Da, skládá se ze 42 aminokyselin (YKQCHKKKGGHCFPKEKICLPPSPSSDFGKMDCRWRWKCKKKKGSGK) [12], které tvoří ve středu peptidového řetězce konzervativní sekvenci. Trojrozměrná struktura, která byla určena pomocí nukleární magnetické resonance (NMR), se skládá z 11 bazických zbytků (9 lysinů a 2 argininů). Díky tomu má tento protein kladný náboj. Také v krotaminu je 6 cysteinových zbytků spojených 3 disulfidickými můstky, a to v polohách C4–C36, C11–C30 a C18–C37, což připomíná strukturu lidských β -defensinů. Existují 2 izoformy krotaminu, jejich rozdíl je způsoben záměnou leucinu 19 za isoleucinový zbytek [13], [14].

Krotamin má široké spektrum účinku a vykazuje různé farmakologické aktivity. Stimuluje například uvolňování acetylcholinu a dopaminu v tkáni příčně pruhovaného svalstva, vyvolává uvolňování histaminu v mastocytech (žírných buňkách), stimuluje sekreci inzulinu v β -buňkách slinivky břišní, má analgetické a protinádorové účinky, může pronikat membránou a ireverzibilně depolarizovat membránové proteiny interakcí s Na^+ kanály. Vzhledem k velkému potenciálu krotaminu, byla provedena řada studií s cílem lépe pochopit mechanismy interakce mezi touto složkou a jejími receptory a vztah mezi jeho strukturou a aktivitou. Nedávno byl také prokázán antimikrobiální a antitumorový účinek krotaminu. Bylo zjištěno, že vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Bacillus subtilis* na povrchu epitelu nebo sliznic, a proniká do buňky *Staphylococcus aureus* [15]. Kromě toho působí na bakterie mechanismem oxidačního stresu. Krotamin má také vlastnost dobře pronikat dovnitř buňky. Tyto dva faktory, tj. schopnost penetrace a antimikrobiální účinek, vyvolaly v poslední době zájem řady výzkumníků, a to především u peptidů s krátkým

řetězcem a kationtovým charakterem, což znamená, že silně interagují s lipidovými membránami. Studie ukázaly, že kladně nabitý krotamin elektrostaticky interaguje s negativně nabitými povrchy membrán a může způsobit vznik otvorů, kterými mohou difundovat ionty a malé molekuly [16]. Další studie zase popisovaly, že tento peptid neinteraguje s neutrálními membránami, na rozdíl od membrán záporně nabitých [17]. Protinádorová účinnost krotaminu byla prokázána proti několika agresivním onkogenním buněčným liniím, zatímco proti normálním buňkám krotamin nevykazoval žádnou aktivitu. Skupina vědců také poukázala na to, že krotamin může být nosičem léčiv s nukleovými kyselinami zaměřených na aktivně se množící nádorové buňky. Pro vývoj antimikrobiálních léčiv a protinádorových látek činí tyto schopnosti z krotaminu zajímavou molekulu [13], [14].

Byly provedeny studie na zvířatech [18], které prokázaly pozitivní vliv krotaminu na prostorovou paměť myší, přičemž látka neovlivňovala takové nuance, jako je jejich nálada, úzkost a motorická aktivita. Dále bylo zjištěno, že krotamin má kladný náboj, který mu pomáhá navázat se na záporně nabitou DNA. Označením tohoto toxinu fluorescenční sondou se vytvoří zřetelný pásový vzor [13],[14].

Předpokládá se, že krotamin může působit jako blokátor draslíkových kanálů, vychází to z podobnosti trojrozměrné struktury krotaminu s lidskými β -defensiny. Je však třeba provést další studie [13],[14].

1.1.2 Sarafotoxiny

Sarafotoxiny jsou vazoaktivní, vysoce toxické složky, které mohou ovlivňovat cévní systém a kontrakci srdečního a hladkého svalstva. Byly nalezeny v jedu hadů *Atractaspis en gaddensis*, *Atractaspis microlepidota* a *Atractaspis irregularis*. Sarafotoxiny se skládají z 21–25 aminokyselin s konzervativní sekvencí CXCXXXXXXXXXXDXECXXFCXXXXXXXXXXIW a mají dva disulfidické můstky mezi cysteiny 1–15 a 3–11, bylo identifikováno 6 jeho izoform. Jedna z nich je označována jako sarafotoxin m (SRTX-m) a způsobuje toxicitu u myší v důsledku vazokonstrikce, ale má menší toxicitu než sarafotoxin b (SRTX b). Kardiovaskulární účinky vyvolané s-SRTX (short-sarafotoxins) a l-SRTX (long-sarafotoxins) byly pozorovány v in vivo studiích [14]. Bylo navrženo několik hypotéz vysvětlujících mechanismy, které jsou základem biologické aktivity sarafotoxinů. Po expozici těmito toxiny bylo v kardiovaskulárních a jiných systémech pozorováno zvýšení aktivity fosfolipázy C, která zvyšuje intracelulární hladinu

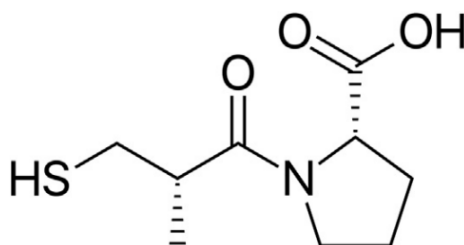
vápníku [Ca^{2+}] a aktivuje proteinkinázu C. Zvýšený obsah vápenatých iontů je jedním z hlavních signálních mediátorů kontraktilního účinku peptidů SRTX v hladkém svalstvu, inotropního účinku v srdečním svalu a aktivity mozečkových astrocytů. Výzkum ve směru studia strukturních vztahů mezi receptory a sarafotoxiny je tedy důležitý, protože tyto peptidy mohou být antagonistickými peptidy a také sondami pro rozpoznání mechanismů onemocnění [14].

1.1.3 Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy (NP) jsou neenzymatické peptidy složené z 25–30 aminokyselin o molekulové hmotnosti 2–3 kDa, jejichž struktura je stabilizována disulfidickými vazbami. Lidské natriuretické peptidy (NP) se dělí na ANP (atriální natriuretický peptid), BNP (mozkový natriuretický peptid) a CNP (srdeční natriuretický peptid nebo natriuretický peptid typu c). Tyto peptidy interagují se svými receptory (NPR), které se nacházejí na povrchu buněk. Po navázání spouštějí intracelulární signalizační kaskádu zahrnující cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Natriuretický peptid má řadu účinků, např. diuretický, natriuretický, hypotenzní a vazodilatační. Ministerstvo zdravotnictví USA schválilo rekombinantní formu NP nesiritid, komerčně známou jako Natrecor, který je se používá pro léčbu akutního městnavého srdečního selhání. Studie však ukázaly [64],[65],[66], že vysoké dávky nesiritidu zhoršují funkci ledvin, zatímco nízké dávky nesiritidu takový účinek nemají. Natriuretický peptid snižují reabsorpci vody v těle, čímž zvyšují její vylučování, což vede ke snížení cirkulujícího objemu krve, srdečního výdeje a krevního tlaku. Natriuretický peptid může také působit proti systému renin-angiotenzin-aldosteron. Vzhledem k výše popsaným účinkům NP, bylo vyvinuto úsilí o izolaci těchto peptidů z hadích jedů, které byly nalezeny u čeledí Elapidae (Korálovcovití), Colubridae (Užovkovití), Dipsadidae, Hydrophiidae, Lamprophiidae a Viperidae (Zmijovití). Nedávno byl z jedu z *Crotalus oreganus abyssus* izolován nový peptid podobný NP (Coa_NP2), který vykazoval hypotenzní účinek závislý na dávce. Z jedu *Dendroaspis angusticeps* (mamba zelená) byl izolován silný natriuretický a hypotenzní peptid (DNP) sestávající z 38 aminokyselinových zbytků. Natriuretické peptidy izolované z hadích jedů mohou být také použity i pro výrobu diuretik, jelikož mají potenciálně vysokou terapeutickou hodnotu. To vysvětluje skutečnost, proč se některé z těchto hadích jedů již po několik staletí používají v tradiční čínské medicíně [7], [13], [14], [19], [20].

1.1.4 Peptidy zesilující účinek bradykininu

Bradykinin je proteolytický produkt endogenního proteinkininogenu. Má hypotenzní účinek tím, že zvyšuje kapilární permeabilitu a vazodilataci. Může být blokován enzymy, jako je metaloproteáza, angiotenzin konvertující enzym (ACE). Faktor (později peptid), který zesiluje účinek bradykininu, byl izolován z brazilské zmiže (*Bothrops jararaca*) [14]. Tyto peptidy mají krátkou délku, tj. 5 až 14 aminokyselin a dělí se do 2 skupin: 1) ty, které obsahují pyroglutamylový zbytek na N konci a sekvenci bohatou na prolin ve srovnání s ostatními aminokyselinami a za 2) ty, které mají prodloužený C konec za sekvenci bohatou na prolin. Prolinové zbytky propůjčují odolnost vůči degradaci proteázami. Bradykinin-potentiating peptides (BPP) inhibují ACE (angiotenzin konvertující enzym), který je jedním z nejdůležitějších v reninangiotenzinovém systému (RAS) a převádí angiotenzin 1 na angiotenzin 2, který je zase silným vazokonstriktorem. Inhibicí ACE tedy BPP zesiluje působení bradykininu, to vede k vazodilataci a hypotenzii. V současné době je k dispozici peptidomimetikum této látky, které se nazývá kaptopril (captopril) (Obrázek 1) nebo kapoten. Tento lék se používá k léčbě hypertenze, městnavého srdečního selhání, infarktu myokardu a diabetické neuropatie. Kaptopril navíc nemusí přímo snižovat produkci aldosteronu tím, že snižuje hladiny ATII (angiotensin II). Aldosteron, hormon zodpovědný za zadržování sodíku a vody v ledvinách, přispívá ke zvýšení cirkulujícího objemu krve a krevního tlaku. Zdrojem kaptoprilu je aktivní aminokyselinová sloučenina Phe-Ala-Pro, identifikovaná sekvenováním BPP. Později byla vyvinuta další léčiva analogická kaptoprilu, jako jsou např. enalapril, lisinopril, ramipril, fosinopril (Monopril®) atd. Užívány jsou jako proléčiva (látky, která je po podání metabolizována na farmakologicky aktivní léčivo [21]) a v těle se přeměňují na aktivní formu [7], [14], [19], [20].



Obrázek 1 Molekula captoprilu

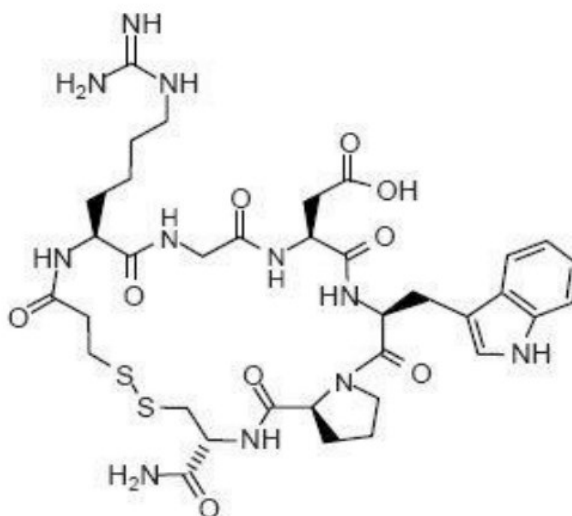
(zdroj:[20])

1.1.5 Dezintegriny

Integriny jsou obecně transmembránové receptory na povrchu buňky, které zajišťují interakci buňky s matrixem. Jsou to glykoproteiny a zajišťují adhezi buněk k proteinům ECM (extracelulární matrix), přičemž mají různou specifitu vůči různým typům proteinů. Existuje mnoho různých integrinů, ale většina z nich má společný rys, a to přítomnost aminokyselinových zbytků arginin-glycin-glycin-aspartátového motivu RGD (Arg-Gly-Asp) ve vazebných místech integrinů. Bylo také prokázáno, že integriny hrají důležitou roli při progresi rakoviny a metastazování [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

Dezintegriny jsou malé neenzymatické proteiny, které jsou antagonisty integrinových receptorů. Napodobují sekvenci RGD a soutěží o vazbu s integriny, narušují signální dráhy, čímž zasahují do jejich funkce, a podílejí se na procesech, jako je migrace a proliferace buněk. Tyto proteiny inhibují agregaci krevních destiček, indukci apoptózy nebo nekrózy tkáně. Disintegriny mají vysokou hustotu disulfidových vazeb a lze je rozdělit do 5-ti skupin podle počtu těchto vazeb a délky polypeptidu. Například skupina s nejmenší velikostí, která zahrnuje dezintegriny sestávající ze 49–51 aminokyselin a mající 4 disulfidové vazby, jako jsou echistatin, eristokofin, eristostatin a ocellatusin. Tyto polypeptidy byly nalezeny v jedech hadů z čeledi Viperinae (zmije) a Crotalinae (chřestýš). Na základě dezintegrinů z hadích jedů bylo vyvinuto několik léčiv, která zabraňují vzniku destičkového trombu, jedná se o Integrilin® a Aggrastat® [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

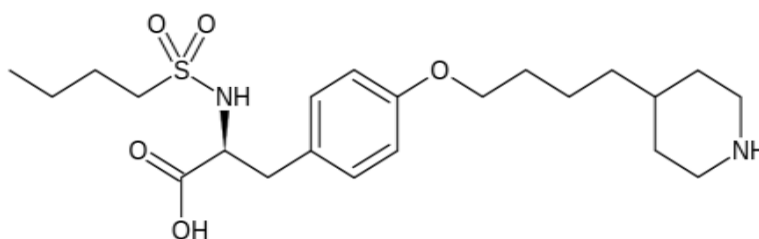
Integrilin neboli eptifibatid (Obrázek 2), N6-(aminoiminomethyl)-N2-(3-merkaptomethyl-L-lysylglycyl-L-aspartyl-L-tryptofyl-L-prolyl-L-cysteinamid, cyklický (1-(6)-disulfid) je inhibitor glykoproteinu IIb/IIIa a blokuje jeho vazbu na fibrinogen a tzv. Willebrandův faktor, indikovaný ke snížení výskytu trombotických kardiovaskulárních komplikací. Tento léčivý přípravek byl vyvinut na základě barburinového dezintegrinu, izolovaného z jedu *Sistrurus miliaris barbouri*. Barburin je schopen vázat se na integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ se sekvencí KGD (Lys-Gly-Asp), neblokuje funkci jiných RGD-dependentních integrinů, čímž specificky ovlivňuje tvorbu trombů adhezí trombocytů [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].



Obrázek 2 Molekula eptifibatidu

(zdroj:[10])

Aggrastat neboli tirofiban (Obrázek 3), [N-(butylsulfonyl)-O-[4-(4-piperidinyl) butyl]-L-tyrosin monohydrochlorid monohydrát]) je inhibitor GPIIb/IIIa (Glykoprotein IIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) je membránový protein, integrin. Hraje důležitou roli v agregaci krevních destiček). Jedná se o peptidomimetikum na bázi echistatinu, dezintegrinu s motivem RGD, který se skládá ze 49 AMK a 4 cysteinových můstků. Echistatin (5,4 kDa, 49 zbytků) se získává z jedu zmije šupinaté *Echis carinatus*. Tento protein se váže na integriny $\alpha_{IIb}\beta_3$ a $\alpha_v\beta_3$, které se nacházejí výhradně na krevních destičkách, a inhibuje agregaci destiček závislou na fibrinogenu, trombinu a kolagenu. Tento lék byl schválen úřadem FDA (Food and Drug Administration) již v roce 1998. Aggrasat je anticoagulant, zabráňuje tvorbě krevních sraženin a může zabránit srdečnímu infarktu nebo jiným problémům s průtokem krve, používá se k léčbě refrakterní ischemie a infarktu myokardu [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].



Obrázek 3 Molekula tirofibanu

(zdroj:[10])

Triflavin, který je izolovaný z jedu z druhu *Trimeresurus flavoviridis*, má molekulovou hmotnost 7,5 kDa. Má silný inhibiční účinek na angiogenezi, což bylo prokázáno studiemi in vitro i in vivo. Protein přímo ovlivňuje interakci fibrinogenu s jeho receptory spojenými s glykoproteinovým komplexem IIb/IIIa. Bylo prokázáno, že triflavin inhibuje interakci extracelulární matrix s určitými receptory ($\alpha 5\beta 1$ a $\alpha v\beta 3$) na buňkách lidského karcinomu děložního hrdla [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

Jarastatin je 6kDa dezintegrin obsažený v jedu z druhu *Botrytis jararaca*, má silný inhibiční účinek na agregaci krevních destiček. Interakce tohoto polypeptidu s neutrofilními integriny může vyvolat buněčnou aktivaci a dynamické změny v systému aktinových vláken. [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

Salmosin, který je purifikovaný z jedu hada korejského (*Agkistrodon halys breviceaudus*) má molekulovou hmotnost 6 kDa. Byla prokázána jeho schopnost inhibovat nádor a metastazování melanomových buněk. In vivo je tato látka schopna inhibovat nádorovou angiogenezi, ale neblokuje normální fyziologické procesy [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

V preklinických studiích se nachází dezintegrin kontortrostatin. Tento má molekulovou hmotnost 13,5 kDa (64 zbytků v každém řetězci) a byl izolován z jedu hada *Agkistrodon contortrix*. In vivo testováním bylo zjištěno, že tato molekula inhibuje růst a metastazování rakoviny prsu a melanomu [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

Mechanismus účinku dezintegrinových sloučenin, zejména jejich schopnost inhibovat buněčnou adhezi, z nich činí kandidáty na inhibitory proliferace nádorových buněk. Proto byla jedna z prvních studií provedena na eristostatinu (purifikovaném z rodu *Eristocophis macmahoni*). Byl studován jeho účinek na stádia metastazování a buněčné migrace. Bylo zjištěno, že tato molekula inhibuje mobilitu melanomových buněk. Eristostatin byl schopen ovlivnit adhezi buněk *Trimeresurus flavoviridis* occ MV3 (Lidská melanomová buněčná linie) i CHOa4 (z angl. Chinese hamster ovary cells a4.; buňky vaječníků čínského křečka) k $4\beta 1$ -ligandu VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1), zatímco adheze prostřednictvím jiných integrinů nebyla inhibována [7], [10], [13], [14], [19], [20], [22].

1.1.6 Three-finger toxin

Tříprstové toxiny (three-finger toxin) jsou neenzymatické proteiny sestávající z 60–75 aminokyselin a mající molekulovou hmotnost 6–8 kDa. Three-finger toxin (3FTx) vypadají jako záhyb skládající se z β -skládaných listů vycházejících ze středu, jsou stabilizovány

disulfidovými můstky. Tato trojnásobná konformace dává těmto toxinům při interakci s cílovými buňkami specifčnost. Rodina proteinů three-finger toxin se skládá z neurotoxinů (kuraremimetických a muskarinových) a kardiotoxinů. Tyto toxiny jsou přítomny v jedech většiny hadů elapidů, zmijí, hydrofidů, krotalidů a kolubridů. Všechny molekuly patřící do této skupiny, ačkoli mají podobnou strukturu, mají širokou škálu biologických účinků [8], [9], [13], [14].

Peptidy patřící mezi neurotoxiny se v nervosvalových spojích kompetitivně vážou na acetylcholinové receptory (ACHR), blokují jejich otevírání a zabraňují acetylcholinu vytvářet póry, kterými procházejí vápníkové a sodíkové kationty, čímž toxiny narušují výměnu signálů mezi buňkami a tím narušují fyziologické funkce. Neurotoxiny se dělí na kuraremimetika neboli α -neurotoxiny a kneurotoxiny neboli muskarinové toxiny, a to podle jejich selektivity pro receptory na acetylcholinové receptory (nAChRs), muskarinové acetylcholinové receptory (mAChRs) a vápníkové kanály [8], [9], [13], [14].

Jedním ze zástupců neurotoxinů je cobrotoxin (Cbtx). Jedná se o postsynaptický α -neurotoxin a má vysokou afinitu k nAChRs (nicotinic acetylcholine receptors), zvyšuje hladinu acetylcholinu, v důsledku čehož může dojít k inhibici signálů bolesti a snížení vnímání bolesti. Tento toxin je purifikován z jedu hada *Naja naja kaouthia* (kobra monoklová) a *Naja atra* (kobra čínská). Jeho molekulová hmotnost je 7,8 kDa a skládá se ze 71 AMK a obsahuje 5 disulfových můstků. Studie ukazují [23], že kobratoxin může zmírnit středně silnou až silnou bolest, což z něj činí účinné analgetikum. Chemickou modifikací detoxikací cobratoxinu vznikly léky jako RPI-MN a RPI-78M (patentované proteiny, odvozené od α -kobratoxinu.). Ty mají potenciál v antivirovém a analgetickém směru. Tato léčiva jsou pro člověka bezpečná a bez zjištěných vedlejších účinků [23]. V roce 2005 společnost Nutra Pharma oznámila [24], že podle preklinických studií je RPI-MN (pepteron) velmi účinný proti kmenům HIV (Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti), rezistentním k lékům. Od roku 2023 se lék zkoumá pro léčbu infekcí způsobených virem herpes simplex. Může tedy být potencionálně antivirovým léčivem pro léčbu HIV a dalších virů [8], [9], [13], [14].

α -kobrotoxin je v Číně schválen k použití jako analgetikum při středně silné až silné bolesti. Jeho vysoká biologická aktivita však může vést k nežádoucím účinkům, jako je např. zástava dýchání. [8], [9], [13], [14].

Z jedu *D. Russelii* byl rovněž izolován neurotoxický peptid, který způsobuje inhibici záškubů lýtkového svalu sedacího nervu *Rana hexadactyla*. [8], [9], [13], [14].

Mezi tříprsté toxiny patří i peptid Waglerin 1, o němž bude více pojednáno níže. Tento toxin může inhibovat svalové kontrakce, a tím zmenšovat i vrásky [8], [9], [13], [14].

Neurotoxické tříprsté proteiny lze použít také jako farmakologické nástroje ke studiu receptorů, jejich funkce a specifity. Kuraremimetické toxiny byly nezbytné pro izolaci a charakterizaci svalových (α -1) AChR, zatímco k-toxiny a muskarinové toxiny poskytly molekulární informace, které umožnily lépe pochopit různé podtypy muskarinových a neuronálních AChR a jejich úlohu v neurotransmisi [8], [9], [13], [14].

Dalším typem tříprstých toxinů jsou kardiotoxiny obsažené v jedu kobry. Mají účinky typu hemolýza, cytotoxicita a depolarizace srdečních a nervových buněk [8], [9], [13], [14].

Kardiotoxiny interagují s fosfolipidy [25], pronikají buněčnou membránou, destabilizují ji, a tím umožňují toxinu proniknout do buňky a interagovat s jejími organelami, což způsobuje smrt. Tyto toxiny zapojují nekrotické i apoptotické mechanismy [25]. Vědci objevili [26] antiproliferativní účinek kardiotoxinu III (CTX III), izolovaného z jedu Naja atra (Čínská kobra) na buňky jater a karcinomu dutiny ústní. Zastavuje buněčný cyklus a iniciuje kaspázou indukovanou apoptózu. Toxin rovněž inhibuje migraci buněk karcinomu prsu. Kromě toho byly prokázány antibakteriální účinky kardiotoxinů. Narušení bakteriální membrány a destabilizace lipopolysacharidů byly testovány na kulturách *Escherichia coli*. Další kardiotoxin, β -kardiotoxin, izolovaný z jedu z druhu *Hannia ophiophagus*, snižoval u anestetizovaných zvířat srdeční frekvenci. Studie kardiotoxinu 1 ukázala, že jeho podávání vede ke stimulaci produkce inzulínu linií β -buněk slinivky břišní a nemá škodlivý vliv na životaschopnost buněk [8], [9], [13], [14], [26].

1.1.7 Fosfolipáza A2

Fosfolipáza A2 (PLA2) je enzym, který katalyzuje hydrolýzu esterové vazby v glycerofosfolipidech, což vede ke štěpení na mastné kyseliny a lysofosfolipidy, které narušují biologické membrány a vedou k lýze. Tento enzym má konzervovanou AMK sekvenci s molekulovou hmotností 13–19 kDa a má 5–8 disulfových můstků. Mechanismus účinku fosfolipázy však závisí také na konkrétní skupině a typu receptorů, na které se tento enzym váže. Skupiny PLA2 1 a 2 interagují se svalovými receptory, což způsobuje myotoxicitu a antikoagulační aktivitu s lokálním poškozením tkáně. Enzymy skupiny 3 interagují s neurologickými receptory. Fosfolipáza A2 skupiny 3 působí post- i presynopticky tím, že interaguje s acetylcholinovými receptory a blokuje jeho vazbu na receptory. Studie ukazuje [27], že jedna z izoform PLA2 izolovaná z jedu *B. jararacussu*

má protinádorové a antimetastatické účinky, to může ovlivnit její využití při léčbě rakoviny prsu. Další studie [28] týkající se PLA2 z jedu *N. nigricollis* ukázaly jeho účinnost při léčbě cukrovky. Enzym má hypoglykemický účinek, tzn. že snižuje hladinu cukru v krvi, a také zvyšuje sekreci inzulínu. Fosfolipáza z jedu stejného druhu hada byla studována také z hlediska inhibice agregace krevních destiček. To naznačuje, že enzym by mohl léčit ischemickou cévní mozkovou příhodu tím, že inhibuje srážení krve inhibicí protrombinázového komplexu a komplexu vnější tenázy (TF-FVIIa) [9], [13], [29].

1.1.8 L-aminooxidáza

L-aminooxidáza (LAO) je enzym, který katalyzuje stereospecifickou oxidaci l-AMK jeho přeměnou na odpovídající α -ketokyseliny za vzniku peroxidu vodíku a amoniaku. Oxidáza patří do třídy flavoproteinů, strukturou jde o homodimerní proteiny s molekulovou hmotností 60–70 kDa, nekovalentně jsou vázány na flavinadenindinukleotid (FAD), který působí jako prostetická skupina. V důsledku tvorby peroxidu vodíku má LAO cytotoxický účinek. Zajímavé je, že LAO vykazuje selektivní cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, což z něj činí kandidáta na vývoj protinádorových léčiv. Může být také spojen s antiparazitární, mikrobiální a virovou aktivitou. Jed pro výzkum byl získán z jihoamerických chřestýšů *Crotalus durissus terrificus* a *Ophiophagus hannah*, známých jako kobra královská [9].

1.1.9 Metaloproteáza

Metaloproteáza je enzym, který využívá jako kofaktor ionty kovů, obvykle Zn^{2+} . Tato proteáza se purifikuje z jedů hadů z čeledi zmijovitých Crotalinae. Z názvu je zřejmé, že se jedná o proteázu, tj. enzym, který může hydrolyzovat proteiny, obvykle extracelulárního matrixu jako je kolagen a laminin, ale může působit i na samotné buňky. To vede k poškození tkáně, krvácení, nekróze. Metaloproteázy se dělí do 3 tříd (P-I, P-II a P-III). Třída PI se vyznačuje nejmenší molekulovou velikostí, přibližně 20 kDa a má pouze jednu metaloproteázovou doménu. Lokálně poškozuje tkáň, což vede ke krvácení. Třída PII obsahuje kromě metaloproteázové domény také dezintegrinovou doménu, která zase interaguje s integrinovými receptory, čímž inhibuje agregaci destiček, což vede k antikoagulačnímu účinku. Poslední třídou je třída PIII, která obsahuje kromě 2 výše uvedených domén ještě doménu bohatou na cystein. Tato třída se vyznačuje největší molekulovou hmotností, a to 60 až 100 kDa. Její účinky jsou poměrně rozmanité, kromě výše uvedených funkcí může tento enzym zasahovat do imunitního systému a iniciovat zánět. Do třídy PIII patří protein jararhagin purifikovaný z *B. Jararaca*, který při testování in

vivo byl schopen snižovat tvorbu uzlů, metastáz a byl schopen je inhibovat antiproliferaci, čehož lze využít jako protinádorového prostředku. Další látka Alfimerase je rekombinantní, přímo působící fibrinolytikum, analog fibrolázy izolovaný z hadího jedu měděnce jižního (*Agkistrodon contortrix contortrix*). Používá se k prevenci vzniku krevních sraženin a k terapii ischemické cévní mozkové příhody [9].

1.1.10 Serinové proteázy

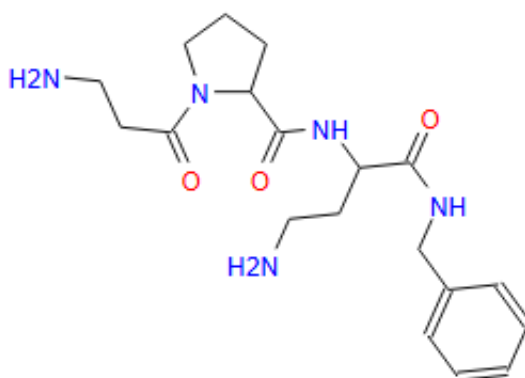
Serinové proteázy tvoří třídu enzymů s vysoce konzervativní sekvencí histidin-aspartát-serin. Mají molární hmotnost 20–35 kDa, skládají se ze 180–240 AMK a mají globulární tvar. Serin v sekvenci Glycin-Alanin-Serin je nukleofil; napadá karbonylový uhlík peptidové vazby a tento fragment štěpí. Serinové proteázy hydrolyzují proteiny, které na sobě mají specifické cíle, takové proteiny se obvykle podílejí na srážení krve, agregaci krevních destiček a fibrinogenezi [7], [8], [9], [13].

Nejnámější látkou příbuznou serinovým proteázám je batroxobin, purifikovaný z jedu *Bothrops atrox* a *Bothrops moojeni*. Tento enzym katalyzuje štěpení řetězce fibrinogenu, hlavního proteinu zodpovědného za srážení krve. Výsledkem štěpení je tvorba fibrinových monomerů, které mohou spontánně polymerizovat za vzniku fibrinové sraženiny, což může podpořit hemostázu. Tyto sraženiny jsou však volné a křehké a snadno se rozpouštějí. Batroxobin má tedy defibrinogenní a antikoagulační účinek a používá se k léčbě trombotických onemocnění. Na základě tohoto enzymu si společnost Pentapharm nechala patentovat dva léky Defibrase® a Reptilase®, které mají účinky na snížení viskozity krve a plazmy, dále zlepšení hemoreologie a mikrocirkulace a používají se při léčbě akutního infarktu a ischemie [7], [8], [9], [13].

2. HADÍ JED V KOSMETICE

V současné době se v kosmetice používá pouze jedna látka izolovaná z hadího jedu rodu *Tropidolaemus wagleri* (zmije templářská), a to Waglerin 1, respektive jeho syntetický analog, prodáváný pod obchodní značkou Syn-Ake (Obrázek 4). Skutečný název této látky je dipeptid diaminobutyroylbenzylamid diacetát (DABBA). Navzdory názvu se jedná o poměrně malou molekulu, která je tripeptidem (3 AMK) s molekulovou hmotností 500 Da. Ostatní názvy, pod kterými se Syn-Ake může vyskytovat jsou: (2S)- β -alanyl-L-prolyl-2,4-diamino-N-(fenylmethyl)-butanamid, H- β -Ala-Pro-Dab-NH-benzyl, H- β -Ala-Pro-DabNHBz, Snake peptide, Dipeptide diaminobutyroyl benzylamide, Snake trippetide či výše zmíněný Syn-Ake [10], [11], [30], [31].

Tento peptid má AMK sekvenci H-bAla-Pro-Dab-NHBn a je to bílý prášek. Lze jej objednat ve specializovaných internetových obchodech. Poprvé byl Syn-Ake syntetizován v roce 2004 a v roce 2006 byl patentován společností Pentapharm Ltd (Švýcarsko). V současné době je společnost součástí DSM Nutritional Products Corporation. Následně byl syntetický vzorec zdokonalen ve společnosti Pharm-Sintez (Moskva). K dnešnímu dni je použití Syn-Ake v kosmetice chráněno mnoha patenty (více než 160), platnými jak v USA, tak v zemích EU i asijském regionu [10], [11], [30], [31].



Obrázek 4 Molekula Syn-Ake

(zdroj: vlastní)

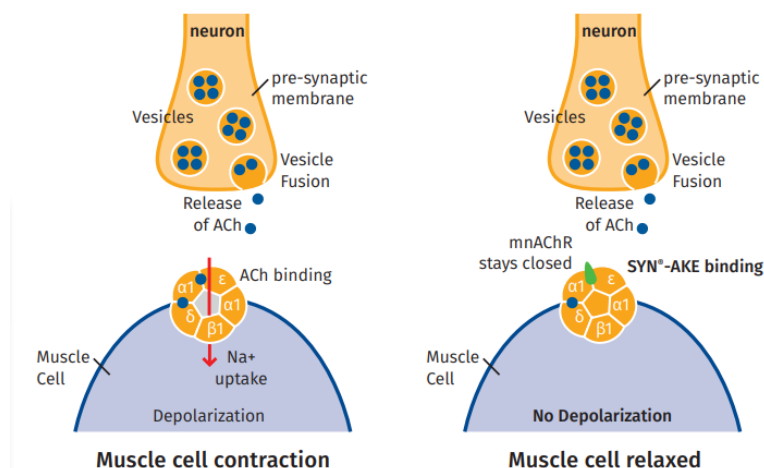
2.1 Mechanismus působení Syn-Aku

Syn-ake, kromě hlavního účinku, má i účinky vedlejší, např. interaguje s enzymy tak, že se na něj váže a tím zpomaluje proces stárnutí. Navíc, studovaný peptid má také antioxidační vlastnosti.

2.1.1 Analog botoxu

Společnost Dsm uvádí, že Syn-Ake působí podobně jako botox, tj. že dočasně paralyzuje obličejové svaly, zastavuje svalové kontrakce, zabráňuje tvorbě a prohlubování mimických vrásek. Základní mechanismus účinku je takový, že peptidová složka je považována za antagonistu svalového nikotinového acetylcholinového receptoru (mnAChR). Jelikož jsou mnAChR reverzibilně blokovány, zůstává iontový kanál uzavřen. Nedochozí k vychytávání Na^+ a svalové buňky zůstávají uvolněné. Přenos nervových impulzů do svalů je inhibován a obličejové svaly se uvolní [32].

Samotný Waglerin 1 je polypeptid obsahující 22 AMK a jednu disulfidovou vazbu. Syn-Ake napodobuje pouze malou část ve Waglerinu 1, a proto snadno proniká ochrannou bariérou kůže. Je také reverzibilním antagonistou mnAChR, což může inhibovat svalové kontrakce, uvolňovat svaly a mít účinky proti vráskám. Působí na postsynaptické membráně tak, že váže podjednotku $\alpha 1-\varepsilon$ svalového nAChR a zaujímá pozici acetylcholinu, takže se acetylcholin nemůže navázat na receptor, což vede k tomu, že receptor zůstává v inaktivovaném stavu. Kromě toho zůstává uzavřen sodíkový iontový kanál, což brání vtoku sodíkových iontů a následně blokuje depolarizaci a přenos nervového vzruchu (Obrázek 5). Proto nemohou být signály nervového vzruchu přenášeny do svalů a svalové buňky se nemohou stahovat, což vede k tomu, že zůstávají v uvolněném stavu [10], [11], [20], [31].



Obrázek 5 Mechanismus působení Syn-Ake

(zdroj:[32])

2.1.2 Interakce Syn-Aku

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou rodinou extracelulárních endopeptidáz závislých na zinku. Tyto enzymy katalyzují rozklad proteinů hydrolyzací jejich peptidových vazeb. V posledních desetiletích bylo zjištěno, že se proteázy podílejí na řízení klíčových fyziologických procesů, jako je proliferace buněk, proces buněčného cyklu, replikace DNA, apoptóza, hojení ran, a dokonce mají vliv i na vývoj rakovinového bujení. Z pohledu kosmetiky je však nejvíce zajímavé zapojení MMP do procesu stárnutí. Matrixové metaloproteinázy se podílejí na udržování homeostázy ECM a regulují mnoho fyziologických procesů prostřednictvím degradačních a syntetických cest. Matrixové metaloproteinázy se dělí do 5 hlavních skupin: kolagenázy (MMP-1, MMP-8 a MMP-13), gelatinázy (MMP-2 a MMP-9); stromelysiny (MMP-3, MMP-10 a MMP-11); matrilysiny (MMP-7 a MMP-26) a (5) MMP membránového typu (MT) (MMP-14, MMP-15 a MMP-16). Zejména degradace kolagenních vláken, která se skládají převážně z kolagenů skupin 1 a 3 je regulována MMP-1. Po štěpení MMP-1 může kolagen dále degradovat pomocí MMP-3 a MMP-9. Matrixové metaloproteinázy v kůži produkují epidermální keratinocyty a dermální fibroblasty. Matrixové metaloproteinázy jsou regulovány tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMP) [33]. Nedávné studie [34], [35] ukázaly, že hladiny MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13, MMP-17, MMP-26 a MMP-27 jsou u starších osob zvýšené. Za normálních okolností jsou MMP a TIMP MMP-27 zvýšené u starších osob a jsou regulovány koordinovaným způsobem, který řídí nadměrnou aktivitu MMP. Množství TIMP-1 v kůži, která prošla stárnutím, však může být sníženo. Tato nerovnováha urychluje fragmentaci kolagenu v dermis, což vede ke

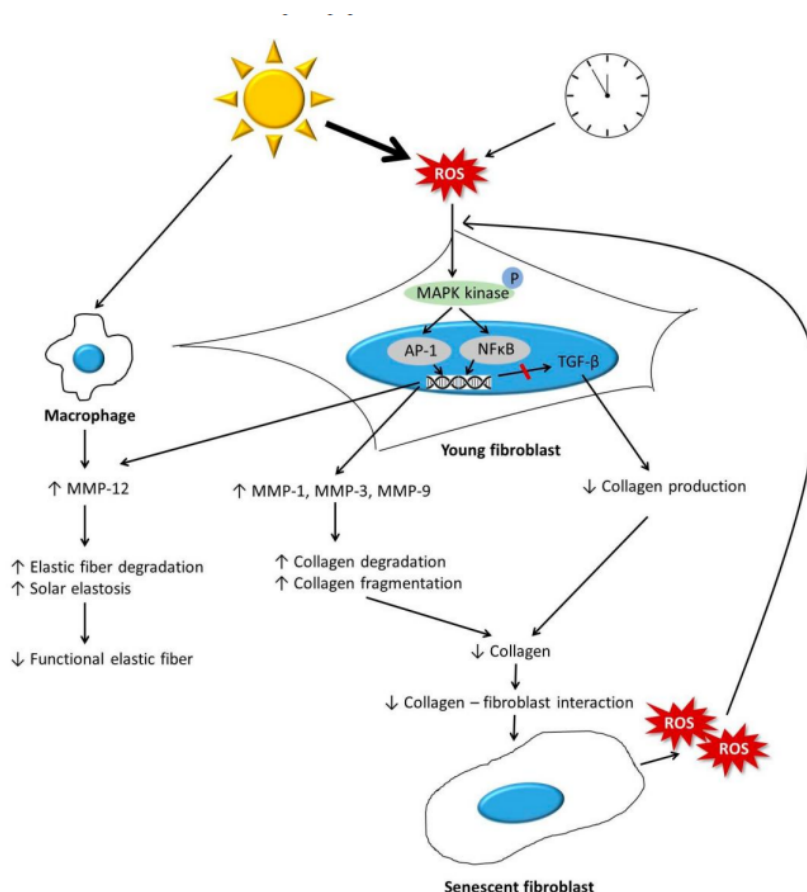
klinickým změnám, jako je např. ztráta elasticity kůže nebo tvorba vrásek. Hlavním spouštěčem zvýšené syntézy MMP je UV záření, které iniciuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxidový aniont (O^{2-}) nebo peroxid vodíku (H_2O_2). Reaktivní formy kyslíku působí nepřímo aktivací mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK), která zahrnuje kinázu regulovanou extracelulárním signálem (ERK), p38 a c-Jun NH2-terminální kinázu (JNK). Tato aktivace indukuje transkripční faktor, aktivátorový protein 1 (AP-1), který hraje důležitou roli v regulaci transkripce MMP-1, MMP-3, MMP-9 a MMP-12. Reaktivní formy kyslíku aktivuje další transkripční faktor, nukleární faktor- κ B (NF- κ B) [33].

Důležité je, že NF- κ B zprostředkovává odpověď na UV záření a fotostárnutí. Aktivita NF- κ B je zodpovědná za zvýšení regulace MMP, jako jsou MMP-1 a MMP-3, v dermálních fibroblastech. Při přirozeném stárnutí jsou hlavním zdrojem zvýšené koncentrace MMP dermální fibroblasty, zatímco při fotostárnutí produkují MMP také epidermální keratinocyty [33], [36], [37].

Sirtuin deacetyláza 1 (SIRT1) je NAD-dependentní enzym, který se nachází především v buněčném jádře. Sirtuiny, stejně jako metaloproteinázy, se podílejí na regulaci celé řady buněčných procesů, hrají důležitou roli v řízení metabolismu, oprav DNA, apoptózy, zánětu, antioxidační rovnováhy a, což je z kosmetologického pohledu nejzajímavější, stárnutí. A také chrání naše tělo před různými chorobami, včetně neurodegenerativních onemocnění, kardiovaskulárních chorob, metabolických syndromů a onkogeneze. Sirtuin deacetyláza 1 navíc katalyzuje deacetylaci acetyllysinových zbytků histonových proteinů H1, H3 a H4 a je úzce spjat s mnoha důležitými signálními drahami, jako jsou NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), FOXO (Forkhead box O), p53 (Nádorový supresor - jaderný protein o velikosti 53 kD), AMPK (AMP activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin) a PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), které zase souvisejí s výskytem stárnutí a chorob souvisejících se stárnutím. Sirtuin deacetyláza 1 se široce podílí na regulaci buněčné senescence a délky života organismu prostřednictvím acetylace a deacetylace těchto substrátů, čímž mění jejich transkripční a enzymatické aktivity [37]. V roce 1999 byl prokázán účinek Sir2 (silent information regulator 2) proti stárnutí, když se ukázalo, že integrace dalších kopií SIRT1 zvyšuje délku života u *Saccharomyces cerevisiae* [38]. Další studie ukázaly [39], že nadměrná exprese genů SIRT1 je spojena se zvýšenou dlouhověkostí. Exprese těchto genů s věkem klesá a nedostatek SIRT1 urychluje procesy stárnutí. Zvýšená exprese SIRT1 hraje

důležitou roli při potlačování buněčné senescence tím, že podporuje buněčnou proliferaci a inhibuje apoptózu. Sirtuin deacetyláza 1 lze aktivovat řadou malých molekul, jako je resveratrol nebo jiné sloučeniny aktivující sirtuin. Aktivace SIRT1 nízkomolekulární agonistou se tak zdá být účinným prostředkem ke zvýšení délky života a boji proti nemocem souvisejícím se stárnutím [33], [36], [37].

Inhibice exprese MMP tak může snížit degradaci kolagenu a zvýšením hladiny SIRT1 může zvýšit počet fibroblastů, a tím zabránit vzniku vrásek (Obrázek 6). Kromě toho jsou pro zastavení procesu stárnutí velmi důležité také látky s antioxidační aktivitou, které opravují molekuly poškozené volnými radikály tak, že je neutralizují (snížují úroveň tzv. oxidačního stresu). Podle volnoradikálové hypotézy stárnutí je hromadění oxidačních poškození způsobených ROS důležitým faktorem procesu stárnutí. Z tohoto důvodu SIRT1 má zásadní význam pro udržení dynamické rovnováhy volných radikálů v živých organismech, prodloužení délky života a zpomalení stárnutí organismu [33], [36], [37], [40].



Obrázek 6 Schematické znázornění změn v
procesu stárnutí pokožky.

(zdroj:[33])

Ve studii [40] byl použit 98% roztok peptidu Syn-Ake od společnosti Cayman Chemical Company. Vazebná energie tripeptidu na receptory MMP a SIRT1 byla vyhodnocena pomocí molekulární dokovací analýzy metodou *in silico*. Bylo zjištěno, že receptor MMP-13, na který se peptid Syn-Ake váže, má nejnižší dokovací energii (energie, potřebná k tomu, aby se těleso dostalo do určité konfigurace) mezi receptory MMP a nejstabilnější vazba probíhá při 8,50 kcal/mol. Následné stabilní sloučeniny tvořily MMP-8 a MMP-1 s dokovací energií -8,05 kcal/mol a -7,24 kcal/mol. Naopak nejnižší a nejstabilnější vazby na receptor SIRT1 dosáhl peptid Syn-Ake (-9,32 kcal/mol). Peptid Syn-Ake vytvářel s receptorem MMP-1 tři vodíkové vazby. Sedm interakcí vodíkové vazby mezi peptidem Syn-Ake a receptorem MMP-8 přispělo k silnější interakci. I přes tvorbu čtyř vodíkových vazeb mezi peptidem Syn-Ake a receptorem MMP-13 se jednalo o receptor s nejnižší dokovací energií mezi receptory MMP. Peptid Syn-Ake dosáhl stabilnější vazby s receptorem SIRT1 než s jakýmkoli jiným receptorem s dokovací energií 9,32 kcal/mol. Tato stabilní vazba se uskutečňovala pomocí tří vodíkových vazeb. Peptid Syn-Ake má molekulovou hmotnost 375 470, donorové číslo 4,25 a akceptorové číslo 8,25, logaritmickou hodnotu poměru oktanol/voda 0,521 a 0,593, vypočtený poměr mozek/krev 0,935 a 0,933 a vypočtené hodnoty PSA 142,05. resp. 139,50, což odpovídá Lipinského pravidlu 5 [41]. Byla vypočtena permeabilita kůže (K_p), která popisuje podíl chemických látek pronikajících přes rohovou vrstvu kůže a která se používá ke kvantifikaci transportu molekul v nejsvrchnější vrstvě kůže a jejího významu pro absorpci [42]. Vypočtené hodnoty K_p byly pro sekvenční receptory uvedeny jako 6,845 a 6,928 cm/h a pohybovaly se v rámci doporučených hodnot 8,0 až 1,0 cm/h [40], [43].

2.1.3 Antioxidační aktivita

K testování peptidů na antioxidační aktivitu se hojně využívá test DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl). Radikálová metoda DPPH je oblíbená pro svou rychlost a citlivost. Analog Waglerinu 1 v devíti koncentracích (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 a 10 mg/ml) byl studován na aktivitu DPPH k odstranění radikálů ze syntetizovaného peptidu. Během experimentu byl vzorek DABBA (100 ml) homogenně smíchán se 100 ml roztoku DPPH radikálu (25 mg/ml rozpuštěného v etanolu) v destičce s 96 jamkami. Míchaný roztok byl poté inkubován při pokojové teplotě a ve tmě po dobu 30 minut. Po inkubaci byla měřena optická hustota roztoku při vlnové délce 517 nm [40]. Procento aktivity DPPH při odstraňování volných radikálů bylo vypočítáno pomocí rovnice (1):

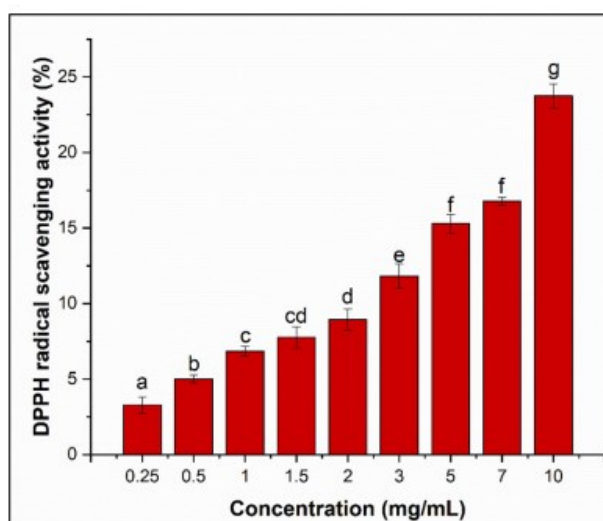
$$DPP \text{ aktivita vychytávání radikálů} = (A_0 - A_1)/A_0 \quad (1)$$

kde:

A_0 – absorpce roztoku DPPH radikálu při vlnové délce 517 nm

A_1 – absorpce vzorku roztokem DPPH radikálu.

Test provedený na peptidu Syn-Ake ukázal, že volné radikály DPPH byly v závislosti na koncentraci výrazně odstraněny (Obrázek 7). Tripeptid má tedy antioxidační aktivitu a minimálně v tomto případě může být účinným omlazujícím prostředkem [40].



Obrázek 7 Závislost DPPH na koncentraci Syn-Aku

(zdroj:[40])

2.2 Testy účinku Syn-Ake

K potvrzení účinku Syn-Ake byla provedena řada testů na dobrovolnících, a to jak tzv. Mothers & Daughters in vivo test, tak tzv. Immediate and Long-term Clinical Benefits of a Topical Treatment for Facial Lines and Wrinkles. Výsledky testů potvrdily příznivý účinek peptidu na stav pokožky.

2.2.1 In vivo test

Společnost DSM provedla v období od 07–09/2019 in vivo studii nazvanou jako Mothers & Daughters, jejíž cílem bylo poskytnout nové důkazy o účinnosti peptidu DABBA při vyhlazování vrásek a poskytnout pro klasifikaci vrásek tzv. barevnou mapu obličeje. Účastnily se jí dvě skupiny dobrovolníků, 57 starších dospělých ve věku 50 až 65 let (dobrovolnicemi byly ženy, a to 54 bělošek, 2 asiátky a 1 zástupkyně smíšené rasy) a 8

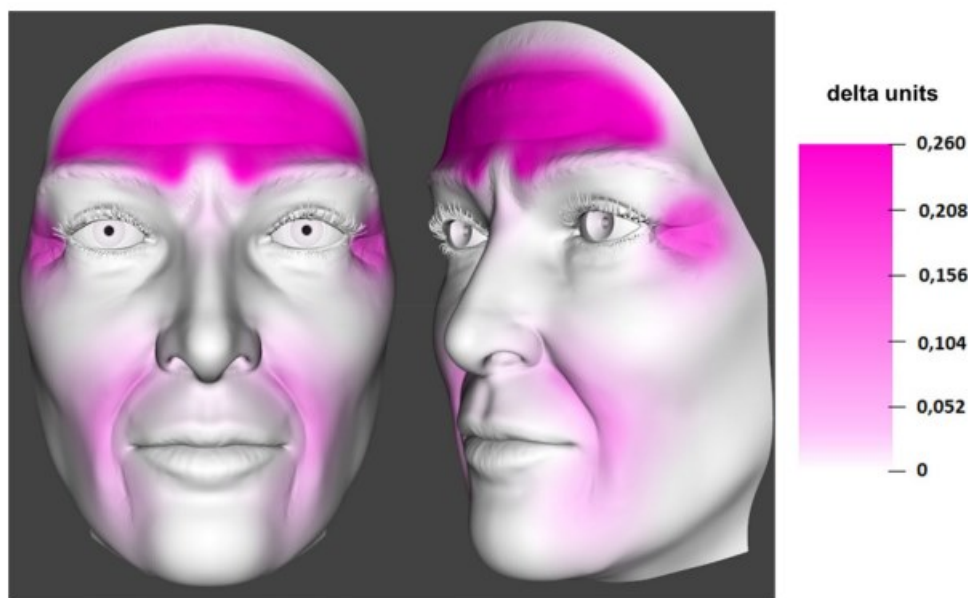
mladších dospělých ve věku 21 až 35 let, které byly dcerami 8 dobrovolnic z 1. zmíněné skupiny dobrovolníků. Všechny dobrovolnice byly fotografovány ve stavu uvolnění, při úsměvu a ve stavu rozzlobení. Jejich výrazové linie byly porovnány v systému VISIA CR (Canfield Imaging Systems, Fairfield, NJ, USA). Kromě toho byly starší dobrovolnice rozděleny do dalších dvou podskupin, a to na skupinu aktivních a placebo, tzn. že si buď aplikovaly 4% diaminobutyroylbenzylamid diacetát (DABBA) Syn-Ake nebo ne. Jejich vrásky byly hodnoceny pomocí obrazové analýzy Primoslite. U 8 dcer ve věku 21–35 let byly vrásky v obličeji hodnoceny od 0 do 3 bodů na modifikované Griffithsově stupnici (kde 0 = žádné a 9 = výrazné vrásky). Dobrovolnice ve věkové skupině 50–65 let měly vrásky mírné až středně výrazné (skóre 3–6) v následujících oblastech: čelo, vějířkovité vrásky, nosoretní vrásky (od nosu ke koutkům úst), marioneta (od koutků úst dolů k bradě). Každá z dobrovolnic měla za úkol dvakrát denně (ráno a večer), po očištění obličeje, nanést malé množství testovaného přípravku (2 mg/cm^2) na celý obličej a nechat jej vsřebat. Na začátku experimentu a ve 4. týdnu byly u dobrovolnic hodnoceny vrásky podle modifikované Griffithsovy škály [44]. Pro studium vývoje vrásek v čase, byly vrásky pro zpracování obrazu segmentovány pomocí speciálních algoritmů. Vrásky pak byly charakterizovány výpočtem jejich povrchu, délky a objemu [45]. Pro vizualizaci účinnosti přípravku bylo následně vytvořeno několik ilustrací. Nejprve bylo provedeno vizuální vylepšení pro zvýraznění vrásek pomocí předběžné úpravy obrazu. Poté byly, pomocí růžové barevné mapy obličeje, hodnoty rozdílu v hodnocení odborníků mezi výchozím stavem a 4. týdnem vykresleny na 3D obraz obličeje. Po 2 týdnech bylo zaznamenáno snížení délky vrásek o $-3,48 \text{ mm}$ a po 4 týdnech o $-3,38 \text{ mm}$. Kromě toho bylo zaznamenáno snížení plochy vrásek o $-0,66 \text{ mm}^2$ po 2 týdnech a $-2,1 \text{ mm}^2$ po 4 týdnech. Viditelné účinky ukazují plochu Crow's Feet na počátku a ve 4. týdnu testování (Obrázek 8) [46].



Obrázek 8 Příklad změny vrásek u dobrovolníku č. 8 a 52

(zdroj:[46])

U skupiny používající přípravek DABBA byla zjištěna změna oproti výchozímu stavu -0,26 jednotky ($p<0,01$) u vrásek na čele, -0,21 jednotky ($p<0,01$) u Crow's Feet, -0,16 jednotky ($p<0,01$) u nosoretní rýhy a -0,12 jednotky ($p<0,05$) u marionetových linií. Byla nakreslena barevná mapa s ohledem na hodnoty delta pro účinnou látku (Obrázek 9). Čím tmavší byla růžová barva, tím větší byl rozdíl, vzhledem k výchozí hodnotě, a tedy vyšší účinnost přípravku. To ukazuje, že hlavní účinek přípravku směřoval do oblasti čela. Kromě vrásek se snížila také hyperpigmentace [46].



Obrázek 9 Barevná mapa obličeje

(zdroj:[46])

Ve skupině, která dostávala k užívání přípravek DABBA, bylo prokázáno významné snížení tvorby mimických vrásek na čele, a to ve srovnání se skupinou, která dostala placebo vzorky. Konkrétně se plocha vrásek snížila o 13,52 % ($p<0,05$ oproti placebo), délka vrásek se snížila o 14 % ($p<0,05$ oproti placebo) a objem vrásek se snížil o 13,59 % ($p=0,076$ oproti placebo). Na rozdíl od čela nebyl zjištěn výrazný rozdíl ve snížení tvorby vrásek u marionetových linií (linií úsměvu) v koutcích úst. U některých dobrovolníků bylo toto snížení jen nepatrně viditelné. Kromě toho došlo také ke snížení vnímání věku a viditelné hyperpigmentace. Ve skupině užívající DABBA se hyperpigmentace skutečně snížila na polovinu, s to ve srovnání se skupinou užívající placebo. V kosmetických klinických studiích je možné se často setkat s tím, že placebo léky mají pozitivní vliv na hydrataci pleti, případně ovlivňují její vzhled, tj. od jemných linek, vrásek až po zářivost a tón pleti. V tomto případě

byl dokonce vyhodnocen významný účinek placebo na některé oblasti obličeje. Peptidová kompozice však ve většině parametrů stále vykazovala lepší výsledky, což spolu s dalšími výše uvedenými výsledky naznačuje, že peptid dále přispívá k účinnosti přípravku. Nebylo však zjištěno žádné zřetelné snížení marionetových linií. Předpokladem bylo, že to může být způsobeno silnější kůží v okolí úst ve srovnání s čelem a že silnější kůže maskuje v této oblasti účinek peptidu. To by mohlo být i důkazem toho, že peptid je schopen modulovat obličejový ovál [46].

2.2.2 Přínosy lokální péče v oblasti obličejových linií a vrásek

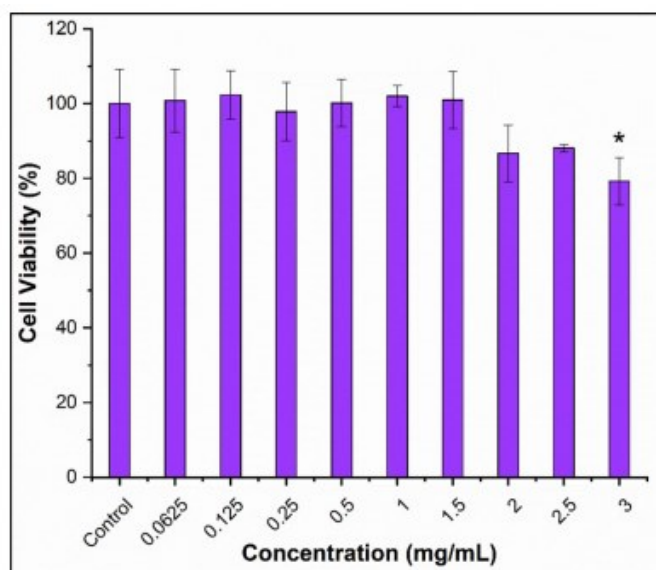
Studie publikovaná v časopise Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology v březnu 2009 uvádí [47], že Syn-Ake prokazatelně rychle vyhlazuje jemné linky a vrásky, zatímco velké vrásky se vyhlazují časem. Studie se zúčastnilo 37 žen ve věku 33 až 45 let s I.—III. typem pleti [48], [49], s vráskami od mírných po hrubé. Testovaný přípravek se skládal z antioxidantů, růstových faktorů, kyseliny hyaluronové a peptidů, jako je palmitoyltripeptid-5, dipalmitoylhydroxyprolin a dipeptid diaminobutyrol diacetát benzylamid (Syn-Ake). Cílem této tříměsíční otevřené studie bylo zhodnotit účinnost a snášenlivost této řady přípravků pro léčbu periokulárních a periorálních vrásek. Vrásky byly hodnoceny na desetibodové stupnici, kde 0 = žádné, 0,5 až 3,5 = mírné, 4 až 6,5 = středně závažné a 7 až 9 = závažné. Dále byla zkoumána snášenlivost přípravku z hlediska objektivních a subjektivních ukazatelů podráždění, konkrétně otoku, olupování, erytému, pálení, svědění a brnění, tyto byly hodnoceny na čtyřbodové stupnici, kde 0 = žádné, 1 = mírné, 2 = středně silné a 3 = silné. Výsledky studie ukázaly viditelné zlepšení, a to že jemné a hrubé periorální vrásky se výrazně vyhladily a dobrovolnice zaznamenaly, že jejich pleť je pevnější a vypnutější. Celkově hodnotily ošetření vysoce pozitivně, 83 % z nich hodnotilo svou celkovou spokojenost po 3. měsíci testování jako dobrou nebo výbornou, Dále, nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky. Průměrné skóre erytému se ve 3. měsíci, oproti výchozímu stavu, snížilo. Tato studie sice neprokazovala přímý účinek Syn-Ake na pokožku, ale prokázala, že tato složka působí pozitivně na stav kůže [47].

2.3 Toxicita Syn-Aku

Z výsledků testů genotoxicity a cytotoxicity peptidu Syn-Ake byla stanovena jeho bezpečná koncentrace na 2 g/ml [40].

2.3.1 Cytotoxicita

K posouzení cytotoxicity peptidu Syn-Ake byla použita MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) analýza. Tento test závisí na mitochondriální aktivitě živých buněk, které přeměňují MTT na krystaly formazanu. Analýza MTT je široce používána k posouzení cytotoxického účinku in vitro léků na buněčné linie nebo primární buňky pacienta. V e studii byly použity koncentrace peptidu 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 a 3 mg/ml a bylo následně dokázáno, že koncentrace peptidu Syn-Ake 3 mg/ml vedla k významnému snížení životaschopnosti buněk ($79,22 \pm 6,36\%$), ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,05$) (Obrázek 10). Podle normy ISO 10993-5:2009 [50] to znamená, že taková koncentrace peptidu způsobuje slabou toxicitu. Při jiných koncentracích však byla životaschopnost buněk vyšší než 80 %, což dle ISO 10993-5:2009 znamená, že látka není cytotoxická. Například koncentrace peptidu v buňce 2,5 mg/ml odpovídá životaschopnosti $88,08 \pm 0,99 \%$, což naznačuje, že bezpečná maximální koncentrace peptidu Syn-Ake je 2,5 mg/ml [40].



Obrázek 10 Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci Syn-Ake

(zdroj:[40])

2.3.2 Genotoxicita

Genotoxicita Syn-Ake byla určena tzv. Amesovým testem. Jedná se o krátkodobý postup bakteriologického testování, který využívá mutantní kmeny *S. Typhimurium* (TA100, TA98, TA97, TA102, TA1535, TA 1537 a TA1538). Konkrétně v této studii byly odebrány

kmeny TA98 a TA100, protože jsou to kmeny nejcitlivější na detekci genotoxicity chemikálií. Mutantní kmen *S. Typhimurium* TA98 detekuje látky, které způsobují mutace s posunem repetice (tzv. frameshift mutation), zatímco mutantní kmen *S. Typhimurium* TA100 detekuje mutagenní látky, které způsobují výměnu párů bází. Byly zkoumány koncentrace peptidu Syn-Ake 1, 1,5, 2 a 2,5 mg/ml. Výsledek experimentu ukázal, že koncentrace 2,5 mg/ml mutantního kmene *S. Typhimurium* TA100 byla nahrazena dvojicí bází ($p < 0,05$). To naznačovalo, že peptid Syn-Ake v koncentraci 2,5 mg/ml nebyl bezpečný. Bylo však zjištěno, že tripeptid v koncentraci nižší než 2,5 mg/ml (1, 1,5 a 2 mg/ml) úspěšně prošel testem, což naznačuje, že nemá genotoxické účinky (Obrázek 11) [40].

Treatment	Concentrations (mg/mL)	Number of revertant colony/plate	
		TA98 Mean $\pm$ SD	TA100 Mean $\pm$ SD
Syn-Ake peptide	1.0	26.3 $\pm$ 2.51	193.0 $\pm$ 3.00
	1.5	23.0 $\pm$ 2.00	195.3 $\pm$ 2.51
	2.0	20.0 $\pm$ 2.00	204.0 $\pm$ 4.00
	2.5	26.0 $\pm$ 1.00	413.3 $\pm$ 5.13*
Positive control (NPD)	0.005	767.0 $\pm$ 8.54*	
Positive control (NaN ₃)	0.0005		859.0 $\pm$ 4.00*
Negative control		24.3 $\pm$ 3.05	194.6 $\pm$ 3.51
Spontaneous control		26.3 $\pm$ 2.51	192.6 $\pm$ 1.52

Asterisks (*) show differences in mean revertant colony numbers between the application and negative control groups that are significant at the level of $p < 0.05$ (Tukey test).

Obrázek 11 Výsledky genotoxicity peptidu Syn-Ake

(zdroj:[40])

2.4 Syntéza peptidu Syn-Ake

Vzhledem k faktu, že Syn-Ake neboli dipeptid diaminobutyroylbenzylamid diacetát se skládá ze 3 AMK, a to lysinu (K), alaninu (A) a prolinu (P), lze analog Waglerinu 1 syntetizovat dvěma hlavními cestami, a to v kapalném i pevném stavu.

2.4.1 Syntéza peptidů na pevné fázi

Syntéza peptidů v pevné fázi (SPPS) poskytuje přesnou kontrolu nad syntézou samotnou a výsledkem je peptid vysoké čistoty [51].

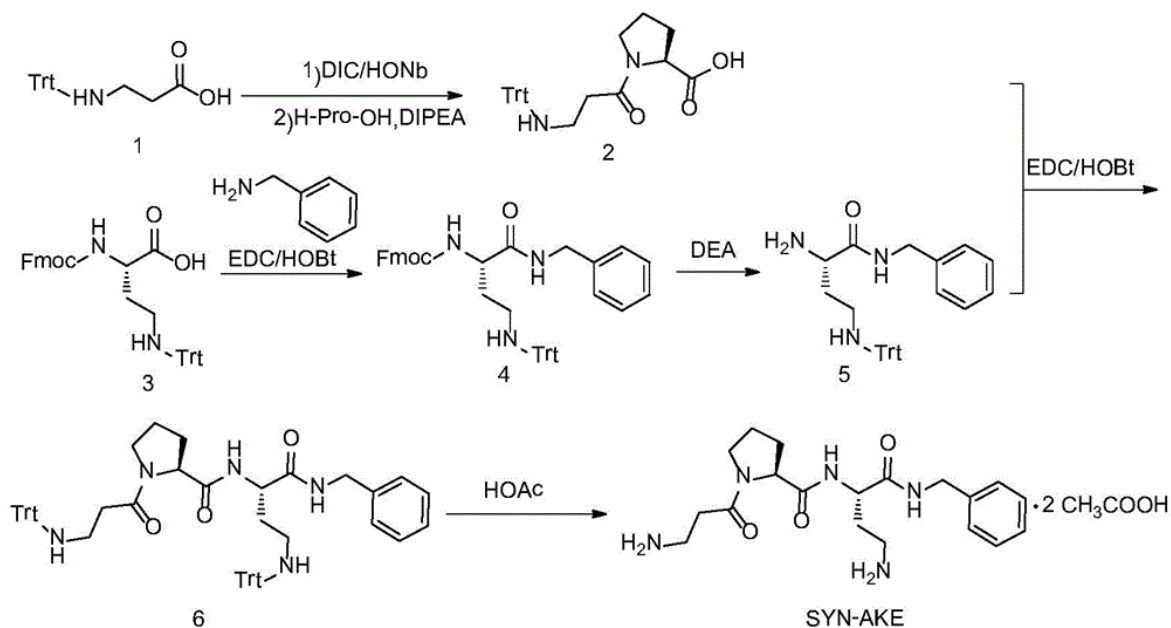
Samotná syntéza probíhá tak, že je tato zahájena ukotvením první aminokyseliny (např. Fmoc-glycinu (Fluorenylmethoxykarbonyl)) na pevný nosič, často pomocí pryskyřice, jako je Wangova pryskyřice nebo Rinkova amidová pryskyřice. Dále je aminokyselina chráněna vhodnou ochrannou skupinou, jako je nebo Boc(terc-butyloxykarbonyl) nebo Fmoc(9-fluorenylmethoxykarbonyl) tak, aby se zabránilo nežádoucím vedlejším reakcím.

Následné aminokyseliny se přidávají krok za krokem pomocí spojování činidel, jako je DIC (diisopropylkarbodiimid) nebo HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát). Po každém spojovacím kroku se N-koncová skupina Fmoc odstraní pomocí deprotekčního činidla, jako je piperidin, čímž se odhalí aminoskupina pro další spojovací reakci. Prodlužování peptidového řetězce pokračuje, dokud se na pevném nosiči nesestaví požadovaná sekvence. Jakmile je syntéza peptidu dokončena, peptid se odštěpí od pryskyřice pomocí štěpného koktejlu obsahujícího TFA (kyselina trifluoroctová) a scavengeru, jako je thioanisol a voda. Surový peptid se poté vysráží a přečistí pomocí technik, např. reverzní fáze HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie), aby se izoloval požadovaný produkt. Přečištěný Syn-Ake peptid se charakterizuje pomocí analytických metod, např. hmotnostní spektrometrií a NMR spektroskopií, aby se potvrdila jeho struktura a čistota [51].

2.4.2 Syntéza peptidů v kapalně fázi

Kromě syntézy v pevné fázi, existuje také metoda syntézy peptidů v kapalně fázi, při níž se Syn-Ake syntetizuje v roztokové fázi, nikoli na pevném nosiči. Syntéza v kapalně fázi nabízí výhody především z hlediska škálovatelnosti a automatizace, takže je především vhodná pro velkovýrobu [52].

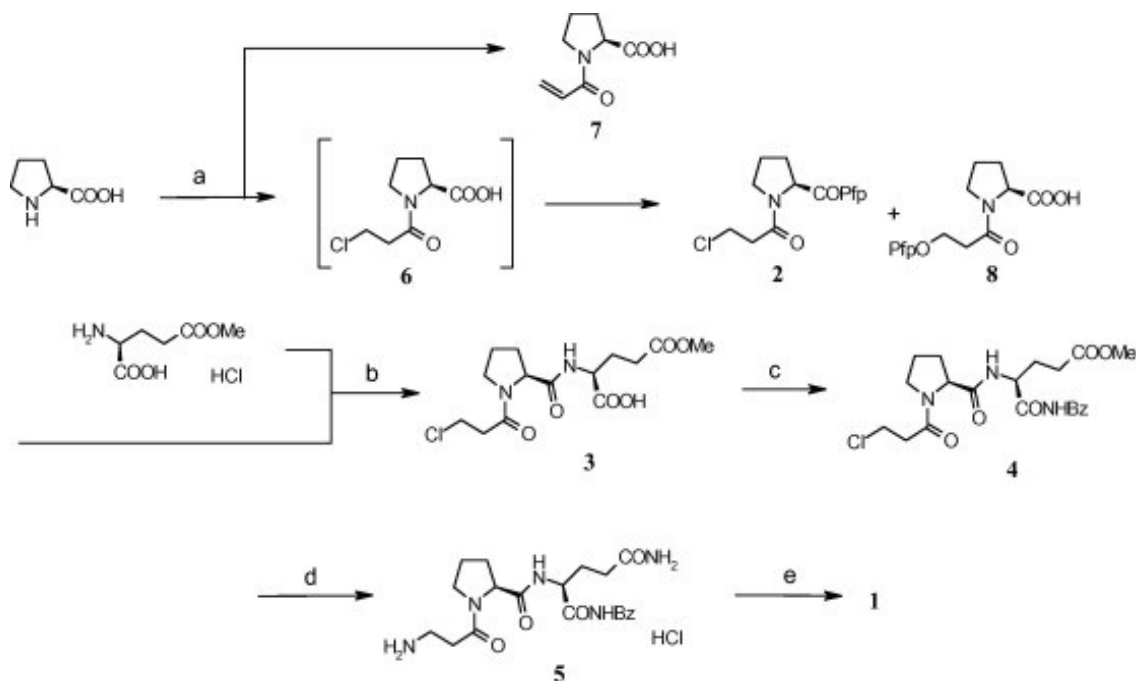
Jiné zdroje však uvádějí [53], že tato metoda výroby tripeptidů vyžaduje ošetření silným alkalickým LiOH, což nejen zvyšuje počet kroků, ale může také vést ke vzniku racemických nečistot. Kromě toho kyselina trifluoroctová způsobuje silnou korozi zařízení. Po odstranění ochranné skupiny Boc se získá trifluoroacetát Syn-Ake a acetát Syn-Ake se už získává čištěním a převodem na sůl na přípravné chromatografické koloně, takže kroky se komplikují a náklady se zvyšují. K překonání těchto nevýhod byla navržena jiná metoda syntézy tripeptidu, která neovlivňuje životní prostředí, umožňuje přímo získat formu syntetického acetátu bez přípravy chromatografické kolony pro čištění a konverzi na sůl a zároveň je překvapivě výrobně jednoduchá (Obrázek 12) [53].



Obrázek 12 Syntéza peptidu Syn-Ake

(zdroj:[53])

V roce 2014 ruští chemici publikovali článek [54] popisující jednodušší a kratší metodu syntézy peptidu Syn-Ake, která využívá snadno dostupné a levné reaktanty (Obrázek 13). Metoda je založena na přeskupení Hofmannova typu jako posledním kroku, jak je znázorněno na schématu níže (Obrázek 13) [54].



Obrázek 13 Metoda syntézy molekuly Syn-Ake, založena na přeskupení Hofmannova typu

(zdroj:[54])

2.4.3 Další metody přípravy Syn-Ake

Kromě technologie pevné a kapalné fáze se pro tvorbu peptidu Syn-Ake používá další zajímavá metoda, a to technologie rekombinantní DNA. Tato metoda spočívá ve vnesení genu kódujícího podobný peptid do hostitelského organismu za účelem jeho výroby. Gen kódující Syn-Ake peptid se nejprve izoluje a klonuje do vhodného vektoru, například plazmidu. Rekombinantní vektor je poté zaveden do hostitelského organismu jako je bakterie nebo kvasinka, a to pomocí technik jako je transformace nebo transfekce. Hostitelský organismus pak rekombinantní DNA replikuje a syntetizuje podobný peptid pomocí svého buněčného aparátu. Syntetizovaný peptid lze získat a přechistit z hostitelského organismu pomocí různých metod, jako je buněčná lýza a chromatografie. Purifikovaný syntetický peptid se následně charakterizuje, aby se potvrdila jeho identita a čistota [55], [56].

2.5 Praktické uplatnění Syn-Ake v kosmetice

Ačkoli to nemusí být na první pohled zřejmé, Syn-Ake je v kosmetických kruzích dobře známou složkou. Nejen kosmetika z Jižní Koreje, přední země kosmetického průmyslu, ale i evropští výrobci mají tento peptid ve svých formulacích. Někteří z výrobců a jejich výrobky obsahující právě peptid Syn-Ake jsou uvedeny níže.

2.5.1 Vivaco

Vivaco je český výrobce přírodní kosmetiky, existující na trhu od roku 2001. Všechny svoje produkty vyrábí v České republice, zejména v Olomouci. Zabývá se především přírodní kosmetikou, neobsahující parabeny a s minimem konzervačních látek [57].

Ve své nabídce má dohromady 7 produktů s hadím jedem, 5 z nich je vyráběno pod značkou SERPENSDERM, konkrétně se jedná o Plet'ový krém proti vráskám (Obrázek 14), Omlazující krém na oční okolí (Obrázek 15), Liftingové sérum proti vráskám na pleť a oční okolí (Obrázek 16), Liftingové sérum proti vráskám (Obrázek 17) a Tělové mléko (Obrázek 18). Také je tvůrcem 2 produktů od značky Vivaderm (což je luxusní kosmetika od Vivaco), a to Zpevňující krém proti vráskám SYN-AKE peptide BACK IN TIME (Obrázek 19) a Zpevňující sérum SYN-AKE peptide + squalene BACK IN TIME (Obrázek 20) [57].



Obrázek 14 Plet'ový krém proti vráskám s hadím jedem SERPENSDERM

(zdroj:[57])



Obrázek 15 Omlazující krém na oční okolí s hadím jedem SERPENSDERM

(zdroj:[57])



Obrázek 16 Liftingové sérum proti vráskám s hadím jedem na plet' a oční okolí SERPENSDERM

(zdroj:[57])



Obrázek 17 Liftingové sérum proti vráskám s hadím jedem SERPENSDELM

(zdroj:[57])



Obrázek 18 Tělové mléko s hadím jedem SERPENSDELM

(zdroj:[57])



Obrázek 19 Zpevňující krém proti vráskám SYN-AKE peptide BACK IN TIME

(zdroj:[57])



Obrázek 20 Zpevňující sérum SYN-AKE peptide + squalene BACK IN TIME

(zdroj:[57])

Výrobce uvádí [57], že jeho výrobky jsou účinné, jak proti existujícím vráskám, tak i zpomaluje tvorbu nových vrásek, dále že mají relaxační a regenerační účinky, ulevují od bolesti svalů a kloubů a uvolňují svalovou tensi.

U Plet'ového krému značky SERPENSDERM se např. DABBA ve složení přípravku nachází na 6. místě z celkových 18 složek. Výrobce doporučuje používat tento přípravek ráno i večer na očištěnou pleť. Jemně jej rozetřít na obličej, krk a dekolt. Dále uvádí, že rychlý nástup účinku zaručuje viditelné zlepšení pleti již v průběhu 4 týdnů [57].

U séra se zase doporučuje vmasírovat několik kapek ráno nebo večer do vyčištěné pleti. Sérum je dle výrobce také vhodné jako podkladová báze pod pleťový krém. Díky jemnému složení je navíc vhodné pro každodenní péči o všechny druhy pleti, především pro pleť suchou a unavenou. Kromě peptidu Syn-Ake je ve složení i Skvalen a Hyaluronát Sodný [57].

V krému série BACK IN TIME značky Vivaderm se DABBA ve složení nachází až na 15. místě. Je tedy zřejmé, že ve srovnání s produktem SERPENSDERM, obsahuje menší množství účinné látky, což však nemusí ukazovat na jeho menší účinnost, protože skutečná množství jednotlivých látek v přípravku zjistit pouze kontaktováním s výrobcem. Dále má ve svém složení také Meruňkový olej, Kolagen a jednu z forem vitamínu E. Mezi účinky, které jsou výrobcem popsány patří zpevnění, vyhlazení a rozjasnění pokožky [57].

Sérum SYN-AKE peptide + squalene má podle INCI stejné složení jako sérum od značky SERPENSDERM, rozdíl může být pouze v procentuálním zastoupení jednotlivých složek [57].

2.5.2 Diet Esthetic Laboratory

Diet Esthetic Laboratory je španělská společnost specializující se na design, výrobu a marketing kosmetických produktů. Funguje od roku 1985. Tento výrobce je manufaktura s vlastní továrnou a zavedenou výrobou, která nabízí jiným společnostem prodej jejich výrobků pod vlastní značkou nebo výrobu výrobků podle receptury zákazníka či pomoc při realizaci receptur zákazníka [58].

Ve své nabídce má jedem krém s hadím jedem, a to ANTIWRINKLE CREAM 50 ML SKINCARE SNAKE ACTIVE. Popis výrobku uvádí [58], že přípravek revitalizuje a regeneruje pokožku, dodává jí mladší a zářivý vzhled, rozjasňuje a vyrovnává tón pleti, čímž pomáhá dosáhnout jednotnější a zářivější pleti. Díky svým hlubkovým hydratačním schopnostem poskytuje tento krém komplexní denní i noční péči, vhodnou pro všechny typy pleti [58].

Ve svém složení, má velkou míru dalších účinných látek, jako jsou kyselina hyaluronová, retinol, koenzym Q-10, kolagen, elastin, vitamin B a E. Ale na druhou stranu obsahuje i docela dráždivé konzervanční látky jako jsou Diazolidinyl Urea a Methylthiazolinone, které mohou pokožku iritovat [58].



Obrázek 21 ANTIWRINKLE CREAM 50 ML SKINCARE SNAKE ACTIVE

(zdroj:[58])

2.5.3 Rodial

Rodial je Hi-Tech inovativní značka péče o pleť, kterou v roce 1999 založila podnikatelka a bývalá kosmetická redaktorka Maria Hatzistefanis [59].

V nabídce má 2 produkty s obsahem hadího jedu, a to konkrétně Snake Oil Drops (Obrázek 22) a Snake Serum O₂, ale také patche a masky. Snake Oil Drops, kromě hadího peptidu obsahuje navíc směs olejů z mandlí, broskových jader a babassu, které jsou podpořené vitamínem E [59]. Výrobce uvádí [59], že přípravek pomáhá vyhladit nerovnoměrný tón pleti a zlepšit pružnost pokožky.



Obrázek 22 Snake Oil Drops

(zdroj:[59])

Sérum, podle výrobce, obsahuje přenašeč kyslíku, o kterém je známo, že dodává vitalitu, a zanechává pokožku vyplněnou se zdravě vypadajícím oroseným povrchem, pomáhá vyhladit vzhled pleti, omlazovat pokožku a vyrovnat vzhled jemných linek a vrásek [59].

Obrázek 23 Snake Serum O₂*(zdroj:[59])*

2.5.4 Limoni

Limoni je ruská kosmetická značka, která vyrábí dekorativní kosmetiku, výrobky pro péči o pleť, profesionální štětce na make-up a parfémy. Značka Limoni se objevila v roce 2005 jako výsledek spolupráce mezi italským a ruským týmem. Prvními produkty byla dekorativní kosmetika. Všechno toto zboží bylo vyrobeno v Itálii. Postupem času se začala rozšiřovat geografie výroby (k Itálii bylo připojeno Německo a Francie). Od roku 2014 produkty Limoni v oblasti Skin Care se začaly vyrábět v Korei [60].

Tato značka zaujímá celou řadu produktů s obsahem hadího jedu jako jsou různé krémy (Obrázek 24), toner, tzv. essence (Obrázek 26) a emulze (Obrázek 25), masky noční a tkáňové nebo patche. Navíc má samostatnou produktovou řadu Gold Premium Syn-Ake, s koloidním zlatem, které má antioxidační a antibakteriální vlastnosti (Obrázek 27) [61]. Tato kosmetika je zaměřena na intenzivní boj proti vráskám, obnovuje přirozenou ochrannou bariéru, vyživuje a chrání před negativními vlivy prostředí. Kromě peptidu Syn-Ake obsahuje i několik dalších ingrediencí, například extrakt z vlaštovčího hnízda, extrakt z plodů čocky, niacinamid, hydrolyzát kolagenu, tokoferol acetát, betain, panthenol, extrakt z kmínu, hydrolyzát kolagenu, vodní extrakt z mořských řas, aminokyseliny, vitaminy skupiny B, které by měly v boji proti vráskám pomoci [60].



Obrázek 24 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Cream

(zdroj:[60])



Obrázek 25 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Emulsion

(zdroj:[60])



Obrázek 26 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Essence

(zdroj:[60])



Obrázek 27 Gold Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Cream

(zdroj:[60])

2.5.5 Farm Stay

Značka Farm Stay vznikla v roce 2007 a je to velmi rychle rostoucí značka, která si získala velkou oblibu jak v Koreji, tak i v Evropě a Americe. Jedná se o značku společnosti Myungin Cosmetics, která vyrábí kosmetiku složenou z různých přírodních výtažků [62].

Vyrábí krém s hadím jedem, který se nazývá Farmstay Syn-Ake Revitalizing Cream (Obrázek 28). Výrobce tvrdí, že přípravek zlepšuje vzhled vrásek, pružnost pokožky, posiluje kožní bariéru. Obsahuje taky niacinamid, který pokožku rozjasňuje [63].



Obrázek 28 Farmstay Syn-Ake Revitalizing Cream

(zdroj:[63])

ZÁVĚR

Svoji bakalářskou práci jsem zaměřila na výskyt a využití hadího jedu, jeho syntézu a zpracování vědeckých studií potvrzujících jeho aktivitu a použitelnost v kosmetice. Kromě toho se tato práce zabývá historií používání hadího jedu a přehledem jeho složek, které se dosud v kosmetice nevyužívají.

Výsledky této práce potvrzují, že hadí jed má významný potenciál v kosmetickém průmyslu, zejména v oblasti anti-aging přípravků. Syn-Ake se ukázal jako účinný prostředek v boji proti mimickým vráskám, a to především díky své schopnosti inhibovat svalové kontrakce. Reverzibilní blokace nikotinových acetylcholinových receptorů (mnAChR) zabraňuje přenosu nervových impulsů do svalů, což vede k jejich uvolnění a vyhlazení pokožky. Tento mechanismus účinku je obdobný jako u botulotoxinu, avšak Syn-Ake má nižší toxicitu a je bezpečnější pro dlouhodobé použití.

Kromě redukce vrásek má Syn-Ake také pozitivní vliv na buněčnou regeneraci a ochranu pokožky před oxidačním stresem. Studie ukázaly, že peptid interaguje s matrixovými metaloproteinázami (MMP) a sirtuin deacetylázou 1 (SIRT1), které hrají klíčovou roli v procesech stárnutí a obnovy kožní tkáně. Syn-Ake navíc inhibuje degradaci kolagenu a podporuje syntézu nových strukturálních proteinů, což přispívá ke zlepšení elasticity a pevnosti pokožky.

Výsledky studií rozvěž potvrdily, že Syn-Ake má i významné antioxidační vlastnosti, které chrání pokožku před škodlivými účinky volných radikálů a UV zářením. Testy prokázaly, že peptid účinně redukuje oxidační stres, čímž zpomaluje proces stárnutí pleti. Syn-Ake tak představuje inovativní a bezpečnou alternativu k botulotoxinu v kosmetickém průmyslu. Významným přínosem této práce je zhodnocení dostupných vědeckých poznatků a identifikace potenciálních oblastí pro další výzkum a vývoj v oblasti kosmetiky na bázi hadího jedu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ALBULESCU, Laura-Oana; KAZANDJIAN, Taline; SLAGBOOM, Julien; BRUYNEEL, Ben; AINSWORTH, Stuart et al. A Decoy-Receptor Approach Using Nicotinic Acetylcholine Receptor Mimics Reveals Their Potential as Novel Therapeutics Against Neurotoxic Snakebite. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, roč. 10. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00848>. [cit. 2025-04-09].
- [2] SLAGBOOM, Julien; KOOL, Jeroen; HARRISON, Robert A. a CASEWELL, Nicholas R. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. Online. *British Journal of Haematology*. 2017, roč. 177, č. 6, s. 947-959. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>. [cit. 2025-04-09].
- [3] CASEWELL, Nicholas R.; JACKSON, Timothy N.W.; LAUSTSEN, Andreas H. a SUNAGAR, Kartik. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. Online. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2020, roč. 41, č. 8, s. 570-581. ISSN 01656147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>. [cit. 2025-04-09].
- [4] KOPYLOVA, N.V.; UTKIN, Y.N. Snake poisons - from ancient times to our days. *Nature*, 2018, č. 3, s. 3-11. ISSN 0032-874X. Dostupné z: *Elementy*, https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka. [cit. 2025-04-02]
- [5] NUNN, John F. *Ancient Egyptian medicine*. London: British Museum Press, [1996]. ISBN 0-7141-0981-9.
- [6] UTKIN, Yuri N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. Online. *World Journal of Biological Chemistry*. 2015, roč. 6, č. 2. ISSN 1949-8454. Dostupné z: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>. [cit. 2025-04-09].
- [7] WAHEED, Humera; MOIN, Syed F. a CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2017, roč. 24, č. 17. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170605091546>. [cit. 2025-04-09].
- [8] FERRAZ, Camila R.; ARRAHMAN, Arif; XIE, Chunfang; CASEWELL, Nicholas R.; LEWIS, Richard J. et al. Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. Online. *Frontiers*

- in Ecology and Evolution*. 2019, roč. 7. ISSN 2296-701X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>. [cit. 2025-04-09].
- [9] BEDRAOUI, Anas; SUNTRAVAT, Montamas; EL MEJJAD, Salim; ENEZARI, Salwa; OUKKACHE, Naoual et al. Therapeutic potential of snake venom: Toxin distribution and opportunities in deep learning for novel drug discovery. Online. *Medicine in Drug Discovery*. 2024, roč. 21. ISSN 25900986. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100175>. [cit. 2025-04-09].
- [10] CHAUHARI, B.G. Toxin as a Medicine. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2012, vol. 9, no. 1, s. 7. ISSN 11-18. Dostupné z: *Journal of Current Pharmaceutical Research*, <https://www.jcpronline.com>. [cit. 2025-04-02].
- [11] THAKRE, A.D. Snake Venom Peptides Use In Anti-Ageing Products. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2018, vol. 7, no. 1, s. 6. Dostupné z: IJSR, <https://www.ijsr.net/archive/v7i1/ART20191445.pdf>. [cit. 2025-04-02].
- [12] PEIGNEUR, Steve; ORTS, Diego J.B.; PRIETO DA SILVA, Alvaro R.; OGUIURA, Nancy; BONI-MITAKE, Malvina et al. Crotonamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. Online. *Molecular Pharmacology*. 2012, roč. 82, č. 1, s. 90-96. ISSN 0026895X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>. [cit. 2025-04-09].
- [13] ALSHAMMARI, Altaf K.; ABD EL-AZIZ, Tarek Mohamed a AL-SABI, Ahmed. Snake Venom: A Promising Source of Neurotoxins Targeting Voltage-Gated Potassium Channels. Online. *Toxins*. 2024, roč. 16, č. 1. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins16010012>. [cit. 2025-04-09].
- [14] ALMEIDA, J.R.; RESENDE, L.M.; WATANABE, R.K.; CARREGARI, V.C.; HUANCHAHUIRE-VEGA, S. et al. Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools and Therapeutic Agents. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2017, roč. 24, č. 30. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/0929867323666161028155611>. [cit. 2025-04-09].
- [15] YOUNT, Nannette Y.; KUPFERWASSER, Deborah; SPISNI, Alberto; DUTZ, Stephen M.; RAMJAN, Zachary H. et al. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotonamine.

- Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, roč. 106, č. 35, s. 14972-14977. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>. [cit. 2025-04-09].
- [16] CORONADO, Monika A.; GABDULKHAKOV, Azat; GEORGIEVA, Dessislava; SANKARAN, Banumathi; MURAKAMI, Mario T. et al. Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Online. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2013, roč. 69, č. 10, s. 1958-1964. ISSN 0907-4449. Dostupné z: <https://doi.org/10.1107/S0907444913018003>. [cit. 2025-04-09].
- [17] COSTA, Bruno A.; SANCHES, Leonardo; GOMIDE, Andreza Barbosa; BIZERRA, Fernando; DAL MAS, Caroline et al. Interaction of the Rattlesnake Toxin Crotamine with Model Membranes. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014, roč. 118, č. 20, s. 5471-5479. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp411886u>. [cit. 2025-04-09].
- [18] VARGAS, Liane S.; LARA, Marcus V.S.; GONÇALVES, Rithiele; MANDREDINI, Vanusa; PONCE-SOTO, Luis Alberto et al. The intrahippocampal infusion of crotamine from *Crotalus durissus terrificus* venom enhances memory persistence in rats. Online. *Toxicon*. 2014, roč. 85, s. 52-58. ISSN 00410101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.017>. [cit. 2025-04-09].
- [19] BEDRAOUI, Anas; SUNTRAVAT, Montamas; EL MEJJAD, Salim; ENEZARI, Salwa; OUKKACHE, Naoual et al. Therapeutic potential of snake venom: Toxin distribution and opportunities in deep learning for novel drug discovery. Online. *Medicine in Drug Discovery*. 2024, roč. 21. ISSN 25900986. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100175>. [cit. 2025-04-09].
- [20] PENNINGTON, Michael W.; CZERWINSKI, Andrzej a NORTON, Raymond S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. Online. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018, roč. 26, č. 10, s. 2738-2758. ISSN 09680896. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>. [cit. 2025-04-09].
- [21] NÁRODNÍ ZDRAVOTNICKÝ INFORMAČNÍ PORTÁL. [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2024. ISSN 2695-0340. Dostupné z: <https://www.nzip.cz>. [cit. 2024-11-19].

- [22] GOLUBKOV, V.; HAWES, D.; MARKLAND, F.S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom. *Angiogenesis*. 2003, vol. 6, pp. 213–224. DOI: 10.1023/B:AGEN.0000021396.47009.b0 ISSN 1387-224X. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:AGEN.0000021396.47009.b0>. [cit. 2025-04-02].
- [23] REID, P.F.; QIN, Z.H. (54) USE OF COBRATOXINAS AS AN ANALGESIC. *US Patent*. 2021. [cit. 2025-04-02].
- [24] Nutra Pharma announces RPI-MN shows positive effects against drug-resistant strains of HIV. Available at: <http://www.nutrapharma.com/newsroom/display.php?newsid=52>. [cit. 2025-04-02].
- [25] OWNBY, Charlotte L.; FLETCHER, Jeffrey E. a COLBERG, Terry R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. Online. *Toxicon*. 1993, roč. 31, č. 6, s. 697-709. ISSN 00410101. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90376-T](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90376-T). [cit. 2025-04-09].
- [26] SU, S.-H.; SU, S.-J.; LIN, S.-R.; CHANG, K.-L. Cardiotoxin-III Selectively Enhances Activation-Induced Apoptosis of Human CD8+ T Lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, vol. 193, no. 1, pp. 97–105. DOI: 10.1016/S0041-008X(03)00327-2. ISSN 0041-008X. Dostupné z: ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X03003272>. [cit. 2025-04-02].
- [27] DE VASCONCELOS AZEVEDO, Fernanda Van Petten; ZÓIA, Mariana Alves Pereira; LOPES, Daiana Silva; GIMENES, Sarah Natalie; VECCHI, Lara et al. Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom on human breast cancer cells. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, roč. 135, s. 261-273. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.164>. [cit. 2025-04-09].
- [28] SARMIENTO, Beatriz Elena; SANTOS MENEZES, Luis Felipe a SCHWARTZ, Elisabeth F. Insulin Release Mechanism Modulated by Toxins Isolated from Animal Venoms: From Basic Research to Drug Development Prospects. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 10. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24101846>. [cit. 2025-04-09].

- [29] DAI, Jingfei. The potential benefits of snake venom. Online. *Highlights in Science, Engineering and Technology*. 2022, roč. 19, s. 223-230. ISSN 2791-0210. Dostupné z: <https://doi.org/10.54097/hset.v19i.2855>. [cit. 2025-04-09].
- [30] EMMETSBERGER, J.; MAMMONE, T. Dipeptide diaminobutyroyl benzylamide diacetate postsynaptically inhibits muscle contraction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021, vol. 141. ISSN 0022-202X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-investigativedermatology/vol/141/issue/9>. [cit. 2025-04-02].
- [31] DEBONO, Jordan; XIE, Bing; VIOLETTE, Aude; FOURMY, Rudy; JAEGER, Marc et al. Viper Venom Botox: The Molecular Origin and Evolution of the Waglerin Peptides Used in Anti-Wrinkle Skin Cream. Online. *Journal of Molecular Evolution*. 2017, roč. 84, č. 1, s. 8-11. ISSN 0022-2844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00239-016-9764-6>. [cit. 2025-04-09].
- [32] DSM. Online. Dostupné z: DSM, <https://www.dsm-firmenich.com/>. [cit. 2024-09-27].
- [33] SHIN, Jung-Won; KWON, Soon-Hyo; CHOI, Ji-Young; NA, Jung-Im; HUH, Chang-Hun et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 9. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>. [cit. 2025-04-09].
- [34] QUAN, Taihao; LITTLE, Emily; QUAN, Hehui; QIN, Zhaoping; VOORHEES, John J. et al. Elevated Matrix Metalloproteinases and Collagen Fragmentation in Photodamaged Human Skin: Impact of Altered Extracellular Matrix Microenvironment on Dermal Fibroblast Function. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 5, s. 1362-1366. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2012.509>. [cit. 2025-04-09].
- [35] QIN, Z.; BALIMUNKWE, R.M. a QUAN, T. Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. Online. *British Journal of Dermatology*. 2017, roč. 177, č. 5, s. 1337-1348. ISSN 0007-0963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bjd.15379>. [cit. 2025-04-09].
- [36] FREITAS-RODRÍGUEZ, Sandra; FOLGUERAS, Alicia R. a LÓPEZ-OTÍN, Carlos. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.

- 2017, roč. 1864, č. 11, s. 2015-2025. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.007>. [cit. 2025-04-09].
- [37] CHEN, Cui; ZHOU, Min; GE, Yuchen a WANG, Xiaobo. SIRT1 and aging related signaling pathways. Online. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020, roč. 187. ISSN 00476374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111215>. [cit. 2025-04-09].
- [38] KAEBERLEIN, M.; MCVEY, M. a GUARENTE, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. Online. *Genes & Development*. 1999, roč. 13, č. 19, s. 2570-2580. ISSN 0890-9369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2570>. [cit. 2025-04-09].
- [39] BITTERMAN, Kevin J.; ANDERSON, Rozalyn M.; COHEN, Haim Y.; LATORRE-ESTEVEZ, Magda a SINCLAIR, David A. Inhibition of Silencing and Accelerated Aging by Nicotinamide, a Putative Negative Regulator of Yeast Sir2 and Human SIRT1. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, roč. 277, č. 47, s. 45099-45107. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M205670200>. [cit. 2025-04-09].
- [40] GOK, Bahar; BUDAMA-KILINC, Yasemin a KECEL-GUNDUZ, Serda. Anti-aging activity of Syn-Ake peptide by in silico approaches and in vitro tests. Online. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2024, roč. 42, č. 10, s. 5015-5029. ISSN 0739-1102. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2223681>. [cit. 2025-04-09].
- [41] LIPINSKI, Christopher A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. Online. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004, roč. 1, č. 4, s. 337-341. ISSN 17406749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>. [cit. 2025-04-09].
- [42] CHEN, Chen-Peng; CHEN, Chan-Cheng; HUANG, Chia-Wen a CHANG, Yen-Ching. Evaluating Molecular Properties Involved in Transport of Small Molecules in Stratum Corneum: A Quantitative Structure-Activity Relationship for Skin Permeability. Online. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23040911>. [cit. 2025-04-09].
- [43] POTTS, R.O.; GUY, R.H. A predictive algorithm for skin permeability: The effects of molecular size and hydrogen bond activity. *Pharmaceutical Research*.

- 1995, vol. 12, no. 11, pp. 1628–1633. ISSN 0724-8741. Dostupné z: Springer, <https://doi.org/10.1023/A:1016236932339>. [cit. 2025-04-02].
- [44] AYER, J.; AHMED, A.; DUNCAN-PARRY, E.; BECK, P.; GRIFFITHS, T.W. et al. A photonumeric scale for the assessment of atrophic facial photodamage. Online. *British Journal of Dermatology*. 2018, roč. 178, č. 5, s. 1190-1195. ISSN 00070963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bjd.16331>. [cit. 2025-04-09].
- [45] CAMPICHE, Remo; TREVISAN, Solène; SÉROUL, Pierre; RAWLINGS, Anthony V.; ADNET, Cyprien et al. Appearance of aging signs in differently pigmented facial skin by a novel imaging system. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019, roč. 18, č. 2, s. 614-627. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12806>. [cit. 2025-04-09].
- [46] CAMPICHE, Remo; PASCUCCHI, Francesca; JIANG, Lily; VERGNE, Thibault; CHEREL, Marie et al. Facial Expression Wrinkles and Their Relaxation by a Synthetic Peptide. Online. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021, roč. 27, č. 2, s. 1009-1017. ISSN 1573-3149. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10146-z>. [cit. 2025-04-09].
- [47] TROOKMAN, N.S.; RIZER, R.L.; FORD, R.; HO, E.; GOTZ, V. Immediate and Long-term Clinical Benefits of a Topical Treatment for Facial Lines and Wrinkles. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2009, vol. 3, pp. 7. ISSN 1941-2797. Dostupné z: ResearchGate, <https://www.researchgate.net/publication/45800360>. [cit. 2025-04-02].
- [48] FITZPATRICK, Richard E a ROSTAN, Elizabeth F. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. Online. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2009, roč. 5, č. 1, s. 25-34. ISSN 1476-4172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14764170310000817>. [cit. 2025-04-09].
- [49] MEHTA, Rahul C a FITZPATRICK, Richard E. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. Online. *Dermatologic Therapy*. 2007, roč. 20, č. 5, s. 350-359. ISSN 13960296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00149.x>. [cit. 2025-04-09].
- [50] 10993-5, I. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 2009. Dostupné z: ISO, <https://www.iso.org/standard/42146.html>. [cit. 2025-04-02].

- [51] CREATIVE PEPTIDES. Solid Phase Peptide Synthesis. Online. Dostupné z: <https://www.creative-peptides.com/solid-phase-peptide-synthesis.html>. [cit. 2024-10-20].
- [52] Synthesis of a dipeptide diaminobutyrylbenzylamide (Čína). Přihl.: 2021-11-08. Uděl.: 2022-01-11. CN 113912672 A. Dostupné také z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/72/c3/d0/9235b3dc96262d/CN113912672A.pdf>. [cit. 2025-04-02].
- [53] A liquid phase synthesis of the snake venom peptide SYN-AKE (Čína). Přihl.: 2019-12-27. Uděl.: 2021-06-29. CN 113045623 A. Dostupné také z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/b7/79/a8/97cbbf8162ed35/CN113045623A.pdf>. [cit. 2025-04-02].
- [54] BALAEV, A.N.; OKHMANOVICH, K.A. a OSIPOV, V.N. A shortened, protecting group free, synthesis of the anti-wrinkle venom analogue Syn-Ake® exploiting an optimized Hofmann-type rearrangement. Online. *Tetrahedron Letters*. 2014, roč. 55, č. 42, s. 5745-5747. ISSN 00404039. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.08.117>. [cit. 2025-04-09].
- [55] STEPHENSON, F. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. *Third Edition*. 2016. ISBN 978-0-12-802211-5. Dostupné z: ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/book/9780128022115/calculations-for-molecular-biology-and-biotechnology>. [cit. 2025-04-02].
- [56] KUMAR BHATT, A.; KANT BHATIA, R.; CHAND BHALLA, T. Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship. 2023. ISBN 978-0-12816109-8. Dostupné z: Elsevier, <https://www.elsevier.com/books/basic-biotechniques-for-bioprocess-and-bioentrepreneurship/bhatt/978-0-12-816109-8>. [cit. 2025-04-02].
- [57] Vivaco Český výrobce přírodní kosmetiky. Online. C2025. Available at: <https://www.vivaco.cz>. [cit. 2025-02-21].
- [58] Diet Esthetic. Online. C2023. Available at: <https://dietesthetic.com/en/>. [cit. 2025-02-21].
- [59] Rodial. Online. C2025. Available at: <https://www.rodial.com>. [cit. 2025-02-21].
- [60] Limoni. Online. C2015 - 2025. Available at: <https://limoni.ru>. [cit. 2025-02-21].

- [61] Gold. Online. Dalton. Available at:
https://www.dalton-cosmetics.com/int/explore-dalton/ingredients-library/gold-skin-care-ingredient?srsltid=AfmBOopMnSrT_Ku5m8QOVR7z_4Bqahd0wxWPuvA85zCDU65FJca9JgP_. [cit. 2025-02-21].
- [62] Farm Stay. Online. Kocos Beauty. C2025. Available at:
<https://www.kocosbeauty.cz/farm-stay/#:~:text=Zna%C4%8Dka%20korejsk%C3%A9%20kosmetiky%20Farm%20Stay,i%20v%20Evrop%C4%9B%20%C4%8Di%20Americe..> [cit. 2025-02-21].
- [63] Farmstay Syn-Ake Revitalizing Cream. Online. MYUNGIN COSMETICS CO., LTD. Farm Stay. Available at:
<https://en.fscos.com/product/farmstay-syn-ake-revitalizing-cream/236/category/52/display/1/>. [cit. 2025-02-21].
- [64] O'CONNOR, C.M.; STARLING, R.C.; HERNANDEZ, A.F.; ARMSTRONG, P.W.; DICKSTEIN, K. et al. Effect of Nesiritide in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. Online. *New England Journal of Medicine*. 2011, roč. 365, č. 1, s. 32-43. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100171>. [cit. 2025-04-09].
- [65] SACKNER-BERNSTEIN, Jonathan D.; SKOPICKI, Hal A. a AARONSON, Keith D. Risk of Worsening Renal Function With Nesiritide in Patients With Acutely Decompensated Heart Failure. Online. *Circulation*. 2005, roč. 111, č. 12, s. 1487-1491. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000159340.93220.E4>. [cit. 2025-04-09].
- [66] MOHAMMED, S.F.; KORENIK, J.; CHEN, H.H.; BURNETT, J.C.; REDFIELD, M.M. Nesiritide in acute decompensated heart failure: Current status and future perspectives. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2008, vol. 9, no. 3, pp. 151. ISSN 1558-5535. Dostupné z: Elsevier, <https://mayoclinic.elsevierpure.com/en/publications/nesiritide-in-acute-decompensated-heart-failure-current-status-an>. [cit. 2025-04-02].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Molekula captoprilu.....	17
Obrázek 2 Molekula eptifibatidu	19
Obrázek 3 Molekula tirofibanu	19
Obrázek 4 Molekula Syn-Ake.....	25
Obrázek 5 Mechanismus působení Syn-Ake	27
Obrázek 6 Schematické znázornění změn v	29
Obrázek 7 Závislost DPPH na koncentraci Syn-Aku	31
Obrázek 8 Příklad změny vrásek u dobrovolníku č. 8 a 52	32
Obrázek 9 Barevná mapa obličeje	33
Obrázek 10 Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci Syn-Ake	35
Obrázek 11 Výsledky genotoxicity peptidu Syn-Ake.....	36
Obrázek 12 Syntéza peptidu Syn-Ake	38
Obrázek 13 Metoda syntézy molekuly Syn-Ake, založena na přeskupení Hofmannova typu	38
Obrázek 14 Plet'ový krém proti vráskám s hadím jedem SERPENSDDERM.....	40
Obrázek 15 Omlazující krém na oční okolí s hadím jedem SERPENSDDERM	40
Obrázek 16 Liftingové sérum proti vráskám s hadím jedem na pleť a oční okolí SERPENSDDERM.....	40
Obrázek 17 Liftingové sérum proti vráskám s hadím jedem SERPENSDDERM	41
Obrázek 18 Tělové mléko s hadím jedem SERPENSDDERM	41
Obrázek 19 Zpevňující krém proti vráskám SYN-AKE peptide BACK IN TIME	41
Obrázek 20 Zpevňující sérum SYN-AKE peptide + squalene BACK IN TIME	42
Obrázek 21 ANTIWRINKLE CREAM 50 ML SKINCARE SNAKE ACTIVE	43
Obrázek 22 Snake Oil Drops	44
Obrázek 23 Snake Serum O2	45
Obrázek 24 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Cream	46
Obrázek 25 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Emulsion	46
Obrázek 26 Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Essence.....	46
Obrázek 27 Gold Premium Syn-Ake Anti-Wrinkle Cream	47
Obrázek 28 Farmstay Syn-Ake Revitalizing Cream.....	47