

РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ GLY-HIS-LYS И GLY-HIS-LYS-D-ALA ПРИ КОЖНОЙ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЕ

К. К. Рахметова, Е. С. Мишина, А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев✉, М. Е. Долгинцев, А. И. Бежин

Курский государственный медицинский университет, Курск

Исследование механизмов регенерации при раневом процессе и поиск новых путей повышения эффективности заживления являются одними из актуальных направлений в медицине. Поэтому представляется целесообразным изучение репаративных эффектов регуляторных пептидов, обладающих физиологической полифункциональностью и оказывающих влияние на процессы роста и дифференцировки клеток. Целью исследования было изучить влияние пептидов Gly-His-Lys (GHK) и Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) на процессы регенерации в условиях инфицированной кожной раны у крыс. Рану моделировали на 150 животных путем нанесения на участке спины полнослойной раны, пептиды вводили в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг подкожно в области раны раз в день в течение 3, 7 или 10 суток. Для оценки течения раневого процесса изучали гистологические и морфологические препараты участков раны с прилежащей интактной кожей. GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг оказывал более выраженное, чем GHK, влияние на регенеративные процессы в ране, что отразилось в значимом снижении числа гранулоцитов и лимфоцитов и повышении числа клеток фибробластического ряда, макрофагов и клеточного индекса по сравнению как с контрольной группой ($p < 0,05-0,001$), так и с животными, которым вводили GHK в эквивалентной дозе ($p < 0,05-0,001$). При увеличении дозы до 1,5 мкг/кг эффекты GHK-D-Ala несколько ослабевали. По результатам сравнения исследованных показателей наибольшая активация регенеративных процессов в ране выявлена после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. Таким образом, присоединение D-аланина к C-концу пептида GHK способствовало ослаблению воспалительной реакции и усилению регенеративных процессов при местном введении в условиях инфицированной кожной раны.

Ключевые слова: Gly-His-Lys-D-Ala, GHK-D-Ala, инфицированная рана, регенерация, воспаление

Вклад авторов: К. К. Рахметова — сбор материала, разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; Е. С. Мишина — проведение гистологического и морфологического исследования, анализ и интерпретация данных; А. О. Ворвуль — статистическая обработка данных, написание рукописи; И. И. Бобынцев — разработка концепции и дизайна исследования, научное редактирование рукописи; М. Е. Долгинцев — анализ и интерпретация данных, написание рукописи; А. И. Бежин — разработка концепции и дизайна исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 16 января 2014 г.), проведено с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях; «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012).

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Иванович Бобынцев
ул. К. Маркса, д. 3, г. Курск, 305041, Россия; bobig@mail.ru

Статья получена: 10.02.2022 **Статья принята к печати:** 01.03.2022 **Опубликована онлайн:** 13.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.014

REGENERATIVE EFFECTS OF GLY-HIS-LYS AND GLY-HIS-LYS-D-ALA PEPTIDES IN INFECTED SKIN WOUNDS

Rakhmetova KK, Mishina ES, Vorvul AO, Bobytsev II✉, Dolgintsev ME, Bezhin AI

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Skin wound healing mechanisms and new ways of improving their efficiency represent an important focus in medicine. In this regard, regulatory peptides, which exhibit physiological polyfunctionality and modulate cell growth and differentiation, are of special interest. This study evaluates the effects of Gly-His-Lys (GHK) and Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) peptides in the infected skin wound healing. The wounds were modeled in rats ($n=150$) by full-thickness dorsal skin defects. The peptides were administered intracutaneously at daily doses of 0.5 or 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The healing was assessed on days 3, 7, and 10 by histomorphometric examination of the wounds with adjacent intact skin. GHK-D-Ala administered at daily doses of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ had pronounced positive effect on regeneration processes in the wound, as indicated by significantly reduced numbers of granulocytes and lymphocytes with increased representation of fibroblastic lineages and macrophages, and the resulting higher cellular index ($p < 0.05-0.001$). At higher doses of GHK-D-Ala (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the beneficial effects were less pronounced. According to the comparative morphological examination, the highest positive effect was achieved with 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of GHK-D-Ala. Thus, local administration of the GHK peptide with extra D-alanine at carboxy-terminus significantly mitigated the inflammatory reaction and facilitated the healing of infected skin wounds in rat model.

Keywords: Gly-His-Lys-D-Ala, GHK-D-Ala, infected wound, regeneration, inflammation

Author contribution: Rakhmetova KK — sample collection, concept and design of the study, data analysis and interpretation, writing of the manuscript; Mishina ES — histological and morphological examination, data analysis and interpretation; Vorvul AO — statistical processing of the data, writing of the manuscript; Bobytsev II — concept and design of the study, scientific editing of the manuscript; Dolgintsev ME — data analysis and interpretation, writing of the manuscript; Bezhin AI — concept and design of the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethics Committee of the Kursk State Medical University (Protocol № 1 of January 16, 2014). The study was carried out in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and the Guidelines for conducting preclinical drug trials (Moscow, 2012).

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor I. Bobytsev
Karl Marx St., 3, Kursk, 305041, Russia; bobig@mail.ru

Received: 10.02.2022 **Accepted:** 10.03.2022 **Published online:** 13.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.014

Одним из актуальных направлений медицины является изучение регенераторных механизмов при раневом процессе и поиск новых путей повышения эффективности заживления. Известно, что в регенерации кожи принимают активное участие все три регуляторные системы организма — нервная, эндокринная и иммунная [1, 2]. В связи с этим представляется целесообразным изучение репаративных эффектов регуляторных пептидов, обладающих физиологической полифункциональностью и оказывающих влияние на процессы роста и дифференцировки клеток [3]. В их числе — трипептид глицил-гистидил-лизин $\text{NH}_2\text{-Gly-L-His-L-Lys-COOH}$ (GHK) [4–6], который наряду с влиянием на процессы регенерации ткани обладает антиоксидантными, иммуностимулирующими, противовоспалительными и нейротропными эффектами [7–10]. Ранее было показано ранозаживляющее действие GHK при кожных ранах, однако его выраженность была относительно невысокой [11], вероятно, вследствие высокой протеолитической активности в ране. Поэтому нами была выполнена модификация структуры GHK путем присоединения D-аланина (D-Ala) к C-концу для повышения ее устойчивости к действию протеолитических ферментов и усиления регенераторного действия.

Целью исследования было изучить эффекты пептида GHK и его структурной модификации GHK-D-Ala в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг на процессы регенерации в условиях инфицированной кожной раны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 150 крысах-самцах Вистар массой 180–240 г в возрасте 6–8 месяцев (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и температуре воздуха 22 ± 2 °C. Все подопытные группы включали по 10 крыс.

Инфицированную рану моделировали нанесением на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного полнослойной раны площадью 250 мм².

В работе использовали пептиды GHK и GHK-D-Ala, синтезированные в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрикочно (в двух точках вокруг раны, ежедневно меняя области введения по часовой стрелке на 90°) в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг в 0,1 мл через 24 ч после моделирования инфицированной раны с последующим введением той же дозы препарата каждые 24 ч на протяжении 3, 7 или 10 суток. В контрольной серии животным в аналогичные промежутки времени вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела.

Животных выводили из эксперимента путем забора крови из правого желудочка сердца под эфирным наркозом, что было обусловлено необходимостью получения достаточного количества крови для дальнейших биохимических и иммунологических исследований.

После выведения животных из эксперимента для объективной оценки характера протекания раневого процесса проводили гистологическое изучение раневых аутоптов на 3, 7 и 10 сутки от начала эксперимента. Для морфологического исследования иссекали участок раны с прилегающей интактной кожей, фиксировали в формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Далее

с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфологическое исследование гистологических препаратов выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nicon; Япония) со штатной цифровой камерой. При описании гистологических срезов оценивали выраженность воспалительной реакции, сроки образования грануляционной ткани, появление краевой эпителизации, а также структурную полноценность вновь образованного эпителия.

Морфологическую оценку течения раневого процесса проводили на основе морфометрического исследования гистологических срезов. Для этого при увеличении $\times 400$ на определенном участке гистологического препарата в пределах раневого дефекта под лейкоцитарно-фибринозным струпом проводили подсчет числа клеток фибробластического ряда, макрофагов, гранулоцитов, лимфоцитов до 100 клеток. Результаты выражали в процентах.

Для определения стадии раневого процесса и выраженности регенерации вычисляли клеточный индекс:

$$\text{КИ} = \frac{\text{Фб} + \text{М}}{\text{Гр} + \text{Л}} \times 100\%,$$

где КИ — клеточный индекс, Фб — клетки фибробластического ряда (префибробласты, фибробласты, фиброциты), М — макрофаги, Гр — гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), Л — лимфоциты. Если $\text{КИ} > 1$ ($> 100\%$), преобладают процессы регенерации, если $\text{КИ} < 1$ ($< 100\%$), преобладают воспалительные процессы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R v.4.1.0 [12] в интегрированной среде разработки RStudio Desktop v. 1.4.1717 (RStudio, PBC; США). Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка (функция `shapiro.test()` из стандартного пакета), а равенства дисперсий — критерий Левене (функция `levene.test()` из пакета `lawstat`). В случае подтверждения гипотез для сравнения двух групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) (функция `aov()` из стандартного пакета) с апостериорным тестом Данетта (функция `DunnTest()` из пакета `DescTools`), данные представляли в виде «среднее \pm стандартное отклонение» ($M \pm SD$), M и SD вычисляли с помощью функций `mean()` и `sd()` из стандартного пакета. При отклонении применяли критерий Краскала–Уоллиса (функция `kruskal.test()` из стандартного пакета) с апостериорным тестом Данна (функция `dunn.test()` из пакета `dunn.test`), данные представлены в виде «Медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]» ($Me[1Q; 3Q]$), которые вычисляли с использованием функций `median()` и `quantile()` из стандартного пакета. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что данные морфологического исследования кожной раны, полученной на 3-и сутки после ее моделирования, во всех экспериментальных группах существенно не различаются. На участках повреждения четко выражен поверхностный лейкоцитарно-некротический слой. Кожный дефект заполнен полиморфноклеточной инфильтрацией с преобладанием лейкоцитов. На границе с интактной дермой отмечены признаки отека: единичные расширенные с истонченной

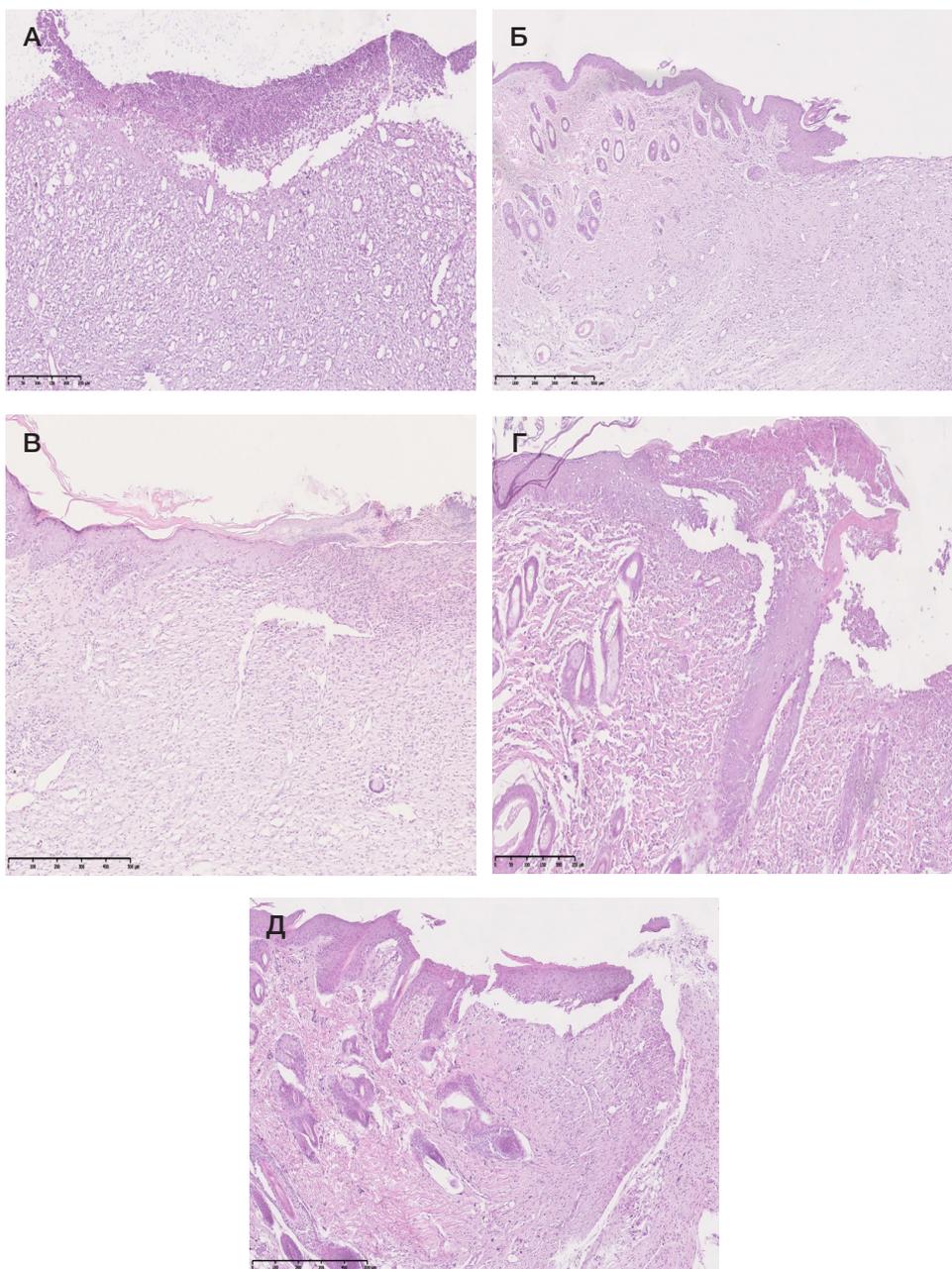


Рис. 1. Микрофотографии фрагментов кожи на месте раны на 10-е сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином; ув. $\times 40$). (А) Контроль. (Б) После введения пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг. (В) После введения пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. (Г) После введения пептида GHK в дозе 1,5 мкг/кг. (Д) После введения пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг

стенкой «пустые» сосуды, набухшие волокна, образующие сеть, более густую ближе к лейкоцитарно-некротическому слою.

На 7-е сутки эксперимента в контрольной группе на участке повреждения обнаружен лейкоцитарно-некротический слой, не всегда четко отграниченный зоной инфильтрации. В нижележащих отделах отмечены начальные этапы формирования грануляционной ткани. Клеточный состав представлен нейтрофилами, гистиоцитами и лимфоцитами. При использовании пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг и пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой все еще присутствует, но он значительно меньших размеров по сравнению с контролем. На участках, где этот слой отсутствует, хорошо различимы наслоения фибрина, который четко отграничен зоной инфильтрации. Нижележащая молодая соединительная ткань богата полнокровными

расширенными капиллярами округлой формы. Признаки отека выражены: эндотелий капилляров умеренно истончен, межструктурные промежутки увеличены. Клеточный состав преимущественно представлен макрофагами, фибробластами и лимфоцитами. При введении животным пептида GHK в дозе 1,5 мкг/кг и пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг отмечено уменьшение признаков отека, лейкоцитарно-некротический струп отсутствует на большем протяжении. На месте повреждения видна грануляционная ткань и тонкими коллагеновыми волокнами, однако на фоне этого присутствует круглоклеточная инфильтрация. Кроме того, в этих группах можно наблюдать начало краевой эпителизации раны в виде утолщения краевого слоя эпидермиса с сохраненной стратификацией.

На 10-е сутки эксперимента в контрольной группе продолжают преобладать воспалительные изменения. В более глубоких слоях соединительная ткань приобретает

Таблица. Динамика изменения морфометрических показателей при гистологическом изучении при введении пептида Gly-His-Lys-D-Ala ($M \pm SD / Me [1Q; 3Q]$, $n = 10$) на 3-и, 7-е, 10-е сутки

Показатель	Группа	Срок		
		3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
Клетки фибробластического ряда, %	Контроль	15,9 ± 2,47	15,9 ± 3,54	20,6 ± 6,67
	ГНК 0,5 мкг/кг	9,5 ± 3,31***	15,2 ± 1,55	22,5 ± 3,50
	ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	17,00 ± 2,49###	43,20 ± 4,44***,###	34,80 ± 1,93***,#
	ГНК 1,5 мкг/кг	11,7 ± 1,77**	22,50 [20,50; 23,00]***	34,8 ± 1,93***
	ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	12,1 ± 3,60**	20,5 ± 1,43**	30,1 ± 3,38***,SSS
Макрофаги, %	Контроль	13,3 ± 3,97	17,6 ± 3,06	16,5 ± 8,18
	ГНК 0,5 мкг/кг	20,7 ± 4,57**	24,4 ± 3,12***	19,4 ± 3,86
	ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	34,60 ± 3,10***,###	23,30 ± 4,57**	33,90 ± 3,14***,##
	ГНК 1,5 мкг/кг	27,1 ± 7,03***	34,3 ± 3,09***	54,2 ± 4,52***
	ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	21,4 ± 5,68***	23,9 ± 4,20**,\$	26,4 ± 3,17***,SSS
Гранулоциты, %	Контроль	55 ± 3,50	36,2 ± 2,30	20,2 ± 5,85
	ГНК 0,5 мкг/кг	46,5 ± 2,22***	36,50 [36,00; 37,75]	28,1 ± 1,20***
	ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	13,00 [12,00; 14,00]***,###	13,50 [11,25; 17,50]***,###	4,00 [3,00; 5,00]***,#
	ГНК 1,5 мкг/кг	18,2 ± 2,53***	23,50 [22,25; 24,75]***	15,5 ± 5,23*
	ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	44,00 ± 3,65***,SS	24,2 ± 2,30***	18,4 ± 1,71
Лимфоциты, %	Контроль	15,8 ± 4,76	30,3 ± 4,06	42,7 ± 8,07
	ГНК 0,5 мкг/кг	23,3 ± 1,25***	24,50 [24,00; 26,00]**	30 ± 3,94
	ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	35,00 [34,25; 36,75]***,#	18,40 ± 3,41***,##	27,70 ± 4,47***
	ГНК 1,5 мкг/кг	43,0 ± 5,10***	21,4 ± 4,58***	19,9 ± 4,46***
	ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	22,5 ± 2,46***,SSS	31,4 ± 3,10\$\$\$	25,5 [25,00; 26,75]***
Клеточный индекс, %	Контроль	37,9 [35,6; 44,9]	51,0 ± 10,35	61,2 ± 20,92
	ГНК 0,5 мкг/кг	43,4 ± 4,69	63,9 [58,7; 68,8]**	72,9 ± 12,14
	ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	108,33 [104,08; 112,77]***,###	206,7 ± 54,09***,###	225,6 ± 46,76***,###
	ГНК 1,5 мкг/кг	65,0 ± 17,35***	128,31 ± 20,26***	184,89 ± 28,27***
	ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	51,1 ± 10,68*	80,7 ± 12,88***	130,1 ± 8,71***,\$

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ в сравнении с группой ГНК 0,5 мкг/кг; \$ — $p < 0,05$; \$\$ — $p < 0,01$; \$\$\$ — $p < 0,001$ в сравнении с группой ГНК 1,5 мкг/кг.

более сформированный вид, как по клеточному составу, так и по виду и качеству волокон. Сохраняется незначительная лимфоцитарная инфильтрация. На границе с гиподермой появляется сформированная зрелая соединительная ткань. В участках, прилежащих к неповрежденной коже, непосредственно на границе с дефектом заметно утолщение базального слоя эпидермиса. При этом на большем протяжении на поверхности раны располагается клеточный детрит (рис. 1А).

В группе с введением пептида ГНК в дозе 0,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой присутствует только в центре раны. Ниже лежащая молодая грануляционная ткань имеет расширенные капилляры округлой формы и вертикальные капилляры слабого кровенаполнения. Волокна более зрелые, чем в контроле. Признаки отека выражены незначительно. Сохраняется незначительная полиморфноклеточная инфильтрация, но преобладают клетки фибробластического ряда. Глубже появляется сформированная зрелая соединительная ткань. В участках прилежащей неповрежденной коже непосредственно на

границе с дефектом заметны утолщение слоев эпидермиса и краевое нарастание новообразованного эпителия. Эпителий имеет нарушенную стратификацию (рис. 1Б).

При введении пептида ГНК-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на 10-е сутки лейкоцитарно-некротический слой отсутствует. Ниже лежащая молодая соединительная ткань богата обескровленными расширенными капиллярами округлой формы. В поле зрения преобладают клетки фибробластического ряда. Заметно прорастание эпителиального лоскута на поверхности грануляционной ткани. Эпителий оформленный, за исключением рогового слоя. По сравнению с размерами дефекта прорастание эпителиального лоскута значительно, на отдельных срезах обнаружено полное покрытие дефекта эпителием. В дерме неповрежденной кожи признаки отека сохранены, но выражены меньше, чем в контроле (рис. 1В).

В группе животных, получавших пептид ГНК в дозе 1,5 мкг/кг, лейкоцитарно-некротический слой все еще присутствует, хотя и заметно меньших размеров, зачастую отслаивается в процессе приготовления

препарата. В таких участках четко видны наслоения фибрина. Нижележащая молодая соединительная ткань богата обескровленными расширенными капиллярами округлой формы. Прорастание эпителиального лоскута происходит по границе между лейкоцитарно-некротическим слоем и слоем молодой грануляционной ткани. Эпителий оформленный, за исключением рогового слоя. По сравнению с размерами дефекта прорастание эпителиального лоскута значимо, на отдельных срезах отмечено полное покрытие дефекта эпителием. Под эпителиальным наростом грануляционная ткань близка по строению к типичной соединительной ткани дермы (рис. 1Г).

При введении пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой присутствует локально. В участках прилежащей неповрежденной кожи непосредственно на границе с дефектом можно наблюдать утолщение базального и зернистого слоев эпидермиса. Прорастание эпителиального лоскута происходит по границе между лейкоцитарно-некротическим слоем и более глубоко расположенной грануляционной тканью, по размеру несколько более обширное, чем в контроле. Эпителий оформленный, кроме самого дистального участка. В дерме признаки отека сохраняются, но выражены значительно меньше, чем в контроле (рис. 1Д).

Проведенный морфометрический анализ подтверждает смену воспалительных изменений на регенеративную фазу (см. таблицу). На всех сроках эксперимента после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг число гранулоцитов было достоверно ниже по сравнению как с контрольной группой (в 3–5 раз; $p < 0,05–0,001$), так и с животными, получавшими GHK (в 3,5–7 раз; $p < 0,05–0,001$), что впоследствии могло отразиться в меньшей выраженности вторичной альтерации в ране и повышении эффективности репаративных процессов. После введения пептидов в дозе 1,5 мкг/кг направленность эффектов сохранялась при меньшей степени различий между пептидами. При этом показатели у животных всех подопытных групп на всех сроках эксперимента были достоверно ниже контрольных значений.

Число макрофагов в группе, получавшей GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг, на всех сроках наблюдения было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05–0,001$), а на 3-и и 10-е сутки — и в сравнении с животными, получавшими GHK. После введения пептидов в дозе 1,5 мкг/кг во всех группах по сравнению с контрольными животными происходило достоверное увеличение числа макрофагов ($p < 0,05–0,001$) при несколько большей выраженности эффекта при использовании GHK ($p < 0,05–0,001$).

Миграция клеток фибробластического ряда в место повреждения, которая отражает начало регенеративных процессов, имела наиболее выраженный характер после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на всех сроках эксперимента в сравнении как с контрольной группой, так и с животными, получавшими GHK. При использовании GHK-D-Ala и GHK в дозе 1,5 мкг/кг направленность эффектов сохранялась ($p < 0,05–0,01$) при отсутствии значительных различий между подопытными группами ($p > 0,05$).

Изменение числа лимфоцитов на разных сроках эксперимента в целом согласуется с динамикой перехода воспалительной реакции в регенеративную фазу. Данный переход был отмечен и по числу других исследованных видов клеток. При введении GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на 3-и сутки наблюдается их значительное увеличение относительно обеих групп сравнения ($p < 0,05–0,001$), тогда как на 7-е и 10-е сутки направленность эффекта

имела обратный характер. Введение GHK в дозе 1,5 мкг/кг вызывало достоверно значимые сдвиги относительно контрольных значений на всех сроках эксперимента ($p < 0,05–0,001$). При этом эффекты GHK-D-Ala имели менее выраженный характер.

Расчет клеточного индекса показал, что наиболее выраженные регенеративные процессы на всех сроках наблюдения развивались после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг ($p < 0,05–0,001$). При использовании GHK в данной дозе существенной активации регенерации не отмечено ($p > 0,05$). Однако при введении GHK в дозе 1,5 мкг/кг на 7-е и 10-е сутки значения клеточного индекса свидетельствуют о преобладании регенеративных процессов и большей выраженности эффекта, чем после введения GHK-D-Ala.

Таким образом, GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг оказывает более выраженное, чем GHK, влияние на регенеративные процессы в ране. При увеличении дозы до 1,5 мкг/кг эффекты GHK-D-Ala несколько ослабевают, а эффекты GHK — возрастают. При этом наибольшие изменения показателей, свидетельствующих об активации регенеративных процессов в ране, отмечены после применения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют об усилении процессов регенерации и ослаблении воспалительной реакции в условиях инфицированной кожной раны после присоединения к С-концу GHK D-аланина. В настоящее время в литературе существуют различные точки зрения на механизмы реализации данных эффектов пептида. Так, в более ранних работах GHK рассматривали как транспортную молекулу для Cu^{2+} . Данные катионы имеют важное значение для завершенности фагоцитоза, полного очищения раны и эффективного заживления. В частности, установлено, что Cu^{2+} связывается N-концом GHK, взаимодействуя с глицином и гистидином [13]. В использованной в нашей работе структурной модификации трипептида N-конец оставался интактным и, следовательно, катионы Cu^{2+} могли взаимодействовать с указанными аминокислотами, а GHK играть роль переносчика катионов. Более поздние исследования показали возможность «самостоятельного» действия GHK за счет способности повышать прикрепление клеток к структурам внеклеточного матрикса дермы, облегчая их передвижение и стимулирование выработки важных сигнальных и структурных молекул, например, факторов роста и декорина [4, 14].

Повышение устойчивости молекулы трипептида к деградирующему действию карбоксипептидаз могло стать основным фактором, обусловившим более высокую стимуляцию регенераторных процессов в ране структурно модифицированной молекулой. Полученные данные согласуются с результатами выполненных ранее исследований, в которых было показано выраженное влияние GHK-D-Ala на фагоцитарную активность гранулоцитов и процессы перекисного окисления липидов при кожной инфицированной ране у крыс [15]. Отмеченный при этом уровень репаративной активности GHK был близок к известному из литературных данных [11].

При анализе полученных данных необходимо также учитывать использованный способ введения пептидов. Цель введения пептидов в область раны — облегчение их доступа к клеткам, участвующим в процессе регенерации. Однако

пептиды могли попадать в системный кровоток и оказывать действие на другие органы и системы. В частности, при внутрибрюшинном введении в сопоставимых дозах GHK оказывал анальгетическое и анксиолитическое действие, что может способствовать ослаблению стрессорной реакции и увеличению регенераторного потенциала с учетом нейроиммунокутанных взаимодействий [2]. Однако присоединение к С-концу трипептида D-аланина нивелировало данные эффекты [16, 17]. В связи с этим обстоятельством можно предположить, что большая эффективность GHK-D-Ala в отношении репаративных процессов в ране была достигнута без участия нейротропных эффектов, описанных для GHK.

Сохранение направленности регенеративных и противовоспалительных эффектов, характерных для GHK, после применения GHK-D-Ala свидетельствует об общности их механизмов. Так, наряду с указанными выше данными литературы, известно, что GHK увеличивает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов 2 (FGF-2) [18]. Кроме того, трипептид улучшает заживление кожных ран и стимулирует обновление кожи за счет высвобождения факторов роста из гранул тромбоцитов (трансформирующий фактор роста

β , TGF β), которые мобилизуют иммунные клетки в области повреждения [19]. Кроме того, GHK снижает продукцию фибробластами провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкин 6 (IL6), что приводит к снижению активности воспаления в коже и препятствует образованию гипертрофических рубцов [20].

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало, что присоединение D-аланина к С-концу пептида GHK способствует усилению регенеративных процессов и ослаблению воспалительной реакции при местном введении в условиях инфицированной кожной раны на 3-и, 7-е и 10-е сутки в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг. GHK-D-Ala способствовал увеличению в ране числа клеток фибробластического ряда, макрофагов на фоне уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов. Результаты настоящей работы свидетельствуют о возможности разработки на основе структурных модификаций пептида GHK эффективных средств для повышения эффективности заживления при кожных раневых процессах. Необходимо продолжать изучение механизмов пептидной регуляции регенераторных процессов.

Литература

1. Башкина О. А., Самотруева М. А., Ажикова А. К., Пахнова Л. Р. Нейроиммуноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (5): 807–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820.
2. Makarevich PI, Efimenko AY, Tkachuk VA Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020; 85 (1): 11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022. PubMed PMID: 32079514.
3. Хавинсон В. Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*. 2020; 98 (3): 165–77. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177.
4. Siméon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol*. 2000; 115 (6): 962–8. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00166.x. PubMed PMID: 11121126
5. Pickart L, Margolina A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (7): 1987. DOI: 10.3390/ijms19071987. PubMed PMID: 29986520.
6. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 648108. DOI: 10.1155/2015/648108. PubMed PMID: 26236730.
7. Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst*. 2005; 10 (1): 17–30. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10105.x. PubMed PMID: 15703015.
8. Mazurowska L, Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *J Cosmet Sci*. 2008; 59 (1): 59–69. PubMed PMID: 18350235
9. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 324832. DOI: 10.1155/2012/324832. PubMed PMID: 22666519.
10. Siméon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1. PubMed PMID: 11045606.
11. Курцева А. А., Смахтин М. Ю., Иванов А. В., Беседин А. В., Чердаков В. Ю. Репаративная и иммунотропная активность пептида gly-his-lys в условиях кожных ран. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2008; (1): 36–40.
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
13. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK-Cu may Prevent Oxidative Stress in Skin by Regulating Copper and Modifying Expression of Numerous Antioxidant Genes. *Cosmetics*. 2015; 2 (3): 236–47. DOI: 10.3390/cosmetics2030236.
14. McCormack MC, Nowak KC, Koch RJ. The effect of copper peptide and tretinoin on growth factor production in a serum-free fibroblast model. *Arch Facial Plast Surg*. 2001; 3 (1): 28–32. PubMed PMID: 11176716.
15. Рахметова К. К., Долгинцев М. Е., Бобынцев И. И., Бежин А. И., Ворвуль А. О., Белых А. Е. Влияние пептида GHK-D-Ala на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной раны. *Человек и его здоровье*. 2021; 24 (1): 54–61. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/07.
16. Bobyntsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MY, Belykh AE. Anxiolytic effects of Gly-His-Lys peptide and its analogs. *Bull Exp Biol Med*. 2015; 158 (6): 726–8. DOI: 10.1007/s10517-015-2847-3. PubMed PMID: 25900608.
17. Бобынцев И. И., Чернышёва О. И., Долгинцев М. Е., Смахтин М. Ю., Белых А. Е. Влияние пептида Gly-His-Lys и его аналогов на болевую чувствительность у мышей. *Экспер. и клин. фармакол*. 2015; 78 (1): 13–15. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-1-13-15.
18. Wang X, Liu B, Xu Q, Sun H, Shi M, Wang D et al. GHK-Cu-liposomes accelerate scald wound healing in mice by promoting cell proliferation and angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 2017; 25 (2): 270–8. DOI: 10.1111/wrr.12520. PubMed PMID: 28370978.
19. Gruchlik A, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-His-Lys and its copper complex on TGF- β secretion in normal human dermal

fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2014; 71 (6): 954–8. PubMed PMID: 25745767.

20. Gruchlik A, Jurzak M, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-

Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes on TNF-alpha-dependent IL-6 secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69 (6): 1303–6. PubMed PMID: 23285694.

References

- Bashkina OA, Samotrujeva MA, Azhikova AK, Paknnova LR. Neuroimmunoendocrine regulation of the skin functioning. *Meditsinskaya Immunologiya.* 2019; 21 (5): 807–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820. Russian.
- Makarevich PI, Efimenko AY, Tkachuk VA Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow).* 2020; 85 (1): 11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022. PubMed PMID: 32079514.
- Khavinson VKh. Peptide medicines: past, present, future. *Clinical Medicine (Russian Journal).* 2020; 98 (3): 165–177. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177. Russian.
- Siméon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol.* 2000; 115 (6): 962–8. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00166.x. PubMed PMID: 11121126
- Pickart L, Margolina A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (7): 1987. DOI: 10.3390/ijms19071987. PubMed PMID: 29986520.
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 648108. DOI: 10.1155/2015/648108. PubMed PMID: 26236730.
- Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst.* 2005; 10 (1): 17–30. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10105.x. PubMed PMID: 15703015.
- Mazurowska L, Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *J Cosmet Sci.* 2008; 59 (1): 59–69. PubMed PMID: 18350235
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 324832. DOI: 10.1155/2012/324832. PubMed PMID: 22666519.
- Siméon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci.* 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00803-1. PubMed PMID: 11045606.
- Kurtseva AA, Smakhtin MYu, Ivanov AV, Besedin AV, Cherdakov VYu. The effects of Gly-His-Lys peptide on neutrophil functions and its regenerative activity in skin wounds. *Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health".* 2008; (1): 36–40. Russian.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK-Cu may Prevent Oxidative Stress in Skin by Regulating Copper and Modifying Expression of Numerous Antioxidant Genes. *Cosmetics.* 2015; 2 (3): 236–47. DOI: 10.3390/cosmetics2030236.
- McCormack MC, Nowak KC, Koch RJ. The effect of copper peptide and tretinoin on growth factor production in a serum-free fibroblast model. *Arch Facial Plast Surg.* 2001; 3 (1): 28–32. PubMed PMID: 11176716.
- Rakhmetova KK, Dolgintsev ME, Bobytsev II, Bezhin AI, Vorvul AO, Belykh AE. Effect of GHK-D-Ala peptide on innate immunity mechanisms and lipid peroxidation processes in infected wounds. *Humans and their Health.* 2021; 24 (1): 54–61. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/07. Russian.
- Bobytsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MY, Belykh AE. Anxiolytic effects of Gly-His-Lys peptide and its analogs. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158 (6): 726–8. DOI: 10.1007/s10517-015-2847-3. PubMed PMID: 25900608.
- Bobytsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MYu, Belykh AE. Effect of Gly-His-Lys peptide and its analogs on pain sensitivity in mice. *Eksper. i klin. farmakol.* 2015; 78 (1): 13–15. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-1-13-15. Russian.
- Wang X, Liu B, Xu Q, Sun H, Shi M, Wang D et al. GHK-Cu-liposomes accelerate scald wound healing in mice by promoting cell proliferation and angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2017; 25 (2): 270–8. DOI: 10.1111/wrr.12520. PubMed PMID: 28370978.
- Gruchlik A, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-His-Lys and its copper complex on TGF-β secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2014; 71 (6): 954–8. PubMed PMID: 25745767.
- Gruchlik A, Jurzak M, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes on TNF-alpha-dependent IL-6 secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69 (6): 1303–6. PubMed PMID: 23285694.