

ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА GHK И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ D-ALA-GHK И GHK-D-ALA НА СОСТОЯНИЕ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ КОЖНОЙ РАНЫ

© Рахметова К.К., Бобынцев И.И., Бежин А.И., Долгинцев М.Е., Ворвуль А.О.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)

Россия, 305041, Курская область, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов пептида GHK и его структурных аналогов на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов при кожном раневом процессе.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 70 крысах-самцах Вистар. Кожную рану моделировали нанесением на участке спины животного полнослойной раны площадью 250 мм². В работе использовали пептиды Gly-His-Lys (GHK), D-Ala-Gly-His-Lys (D-Ala-GHK) и Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) в дозах 0,5 мкг/кг и 1,5 мкг/кг, которые вводили внутривенно в дозах 0,5 мкг/кг и 1,5 мкг/кг в объеме 0,1 мл в течение 3, 7 или 10 суток. Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП). Оценку антиоксидантных механизмов проводили путем определения активности каталазы и общей антиокислительной активности (ОАА) сыворотки крови. Фагоцитарную активность нейтрофилов крови оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ) и фагоцитарному числу (ФЧ). Активность кислородзависимых механизмов в фагоцитах оценивали в спонтанном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест).

Результаты. После введения GHK преобладала тенденция к ФИ, ФЧ и завершенности фагоцитоза, которая в основном сохранялась и при использовании пептидов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala. При этом наиболее устойчивое влияние на фагоцитарную активность оказывал пептид GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг. Полученные в НСТ-тесте данные в определенной степени согласуются с показателями ФИ. При этом эффекты структурных аналогов, в отличие от GHK, проявлялись на протяжении всего эксперимента. Достоверно значимые изменения показателей активности ПОЛ и антиоксидантных механизмов отмечались при применении всех пептидов. Однако их динамика, направленность и выраженность на протяжении эксперимента имели достаточно сложный характер.

Заключение. GHK и его структурные аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala при кожной инфицированной ране оказывают влияние на показатели врожденного иммунитета и ПОЛ в условиях кожной раны, выраженность и направленность которого зависит от срока заживления. При этом наиболее выраженные и устойчивые эффекты наблюдаются при использовании GHK-D-Ala, что свидетельствует о важности защиты молекулы трипептида от действия карбоксипептидаз.

Ключевые слова: GHK; D-Ala-GHK; GHK-D-Ala; кожная рана; фагоцитоз; перекисное окисление липидов.

Рахметова Камила Камильджановна – заочный аспирант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии им. А.Д. Мясникова, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-5511-5962. E-mail: muminovak@mail.ru

Бобынцев Игорь Иванович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии, директор НИИ общей патологии, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-7745-2599. E-mail: bobig@mail.ru (автор, ответственный за переписку)

Бежин Александр Иванович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии им. А.Д. Мясникова, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0003-3776-9449. E-mail: abezin@yandex.ru

Долгинцев Максим Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры патофизиологии, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0002-0923-0166. E-mail: makdol@mail.ru

Ворвуль Антон Олегович – очный аспирант, ассистент кафедры патофизиологии, мл. науч. сотрудник НИИ общей патологии, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0002-1529-6014. E-mail: vorvul1996@mail.ru

Одним из актуальных направлений медицины является изучение регенераторных механизмов при раневом процессе и поиск новых путей повышения эффективности заживления. Поэтому, учитывая сложные и разнообразные механизмы регуляции регенерации кожи [1, 2], представляется целесообразным исследование влияния на данные процессы пептидных молекул с репаративной активностью. В настоящее время для ряда регуляторных пептидов установлено влияние на процессы роста и дифференцировки клеток [3]. В частности трипептид глицил-гистидил-лизин NH₂-Gly-L-His-L-Lys-COOH (GHK) обладает антиоксидантными, им-

мунотропными, противовоспалительными и нейротропными эффектами [4-7], а также действует на процессы регенерации ткани [8-10]. Однако наряду с целым рядом достоинств у препаратов на основе регуляторных пептидов (высокая эффективность в сравнительно низких дозах, отсутствие значительных побочных эффектов) основным их недостатком является быстрая деградация протеолитическими ферментами. Для решения данной проблемы применяются различные способы защиты пептидной молекулы, в том числе путем включения в ее структуру D-изомеров аминокислот.

Ранее нами было установлено, 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 [11]. При этом GHK-D-Ala способствовал увеличению в ране количества клеток фибробластического ряда, макрофагов на фоне уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов. Защита молекулы GHK путем присоединения D-аланина к ее С-концу может повышать ее устойчивость к деградирующему действию карбоксипептидаз и увеличивать продолжительность и выраженность биологических эффектов в сравнении с природной молекулой. Однако при этом закономерно встает вопрос о необходимости исследования аналогичных эффектов молекулы GHK, защищенной D-аланином с N-конца от протеолитического действия аминопептидаз.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов пептида GHK и его структурных аналогов на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов при каждом раневом процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 70 крысах-самцах Вистар массой 200-240 г в возрасте 6-8 месяцев, разделенных на группы по 10 особей. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Кожную рану моделировали нанесением на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного полнослойной раны площадью 250 мм^2 .

В работе использовали пептиды Gly-His-Lys (GHK), D-Ala-Gly-His-Lys (D-Ala-GHK), и Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala), представляющие собой защищенные с N- и С-конца модификации трипептида Gly-His-Lys (GHK), синтезированные в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрикожно (в двух точках вокруг раны, ежедневно меняя области введения по часовой стрелке на 90°) в дозах 0,5 мкг/кг и 1,5 мкг/кг в объеме 0,1 мл через 24 часа после моделирования кожной раны с последующим ежедневным введением препарата на протяжении 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 экс-

перимента путем обескровливания под эфирным наркозом, осуществляя забор крови из правого желудочка сердца на 3-и, 7-е и 10-е сутки соответственно с использованием закрытых систем для взятия крови S-Monovette® (SARSTEDT, Германия) с активатором свертывания. Пробирки со свернувшейся кровью подвергали центрифугированию в течение 10 минут со скоростью 1500 об/мин. Полученную сыворотку замораживали при температуре -20°C .

Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП), которые определяли при помощи спектрофотометра «Arel 330 PD» (Япония). Для оценки уровня МДА использовали набор реактивов «ТБК-Агат». Подсчет концентрации ацилгидроперекисей производили, используя смесь гептана и изопропана с добавлением соляной кислоты. Количество АГП выражалось в условных единицах [12].

Оценку антиоксидантных механизмов проводили путем определения активности каталазы и общей антиокислительной активности (ОАА) сыворотки крови. Активность каталазы измеряли в мккат/л и определяли при помощи спектрофотометра «Arel 330 PD» (Япония) [13]. Для подсчета концентрации ОАА использовали метод, построенный на определении степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА. Оптическую плотность фиксировали на программируемом полуавтоматическом биохимическом анализаторе «БТС-330» (Испания) при длине волны 532 нм через 48 часов инкубации при 40°C [14].

Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови проводили с использованием световой микроскопии путем определения поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов крови по отношению к взвеси предварительно меченной трипановым синим взвеси пекарских дрожжей после их совместной инкубации. Мазки исследовали после 30-минутной и 2-часовой инкубации под иммерсионной системой светового микроскопа. Для характеристики фагоцитоза применяли фагоцитарный индекс (ФИ) – процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество поглощенных частиц пекарских дрожжей на один фагоцит и завершенность фагоцитоза. Данные показатели вычисляли в мазках, окрашенных по Романовскому. Расчет производили на 100 нейтрофилов [15].

Активность кислородзависимых механизмов антиинфекционной защиты в фагоцитах оценивали в спонтанном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). При микроскопии

определяли количество клеток (в %), содержащих отложения диформаза, из расчета на 100 нейтрофилов [16].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R v.4.1.0 [17] 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 Краскела–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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы 1, ГНК и его аналоги оказывали существенное влияние на показатели фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов. При этом ФИ после введения ГНК в дозе 0,5 мкг/кг снижался на 3-и сутки (на 6%, $p < 0,05$), а в дозе 1,5 мкг/кг — на 7-е и 10-е сутки (на 6%, $p < 0,05$ и 23%, $p < 0,001$ соответственно). Динамика изменений ФЧ при введении трипептида в дозе 0,5 мкг/кг на протяжении эксперимента имела разнонаправленный характер: снижение к 3-м суткам (на 37%, $p < 0,001$) и повышение к 10-м (на 21%, $p < 0,01$). Применение ГНК в дозе 1,5 мкг/кг вызывало уменьшение ФЧ как на 3-и сутки (на 53%, $p < 0,001$), так и на 10-е (на 31%, $p < 0,001$). Показатель завершенности фагоцитоза при этом также значимо снижался: к 3-м суткам при дозе ГНК 0,5 мкг/кг (на 10%, $p < 0,01$) и к 3-м (на 22%, $p < 0,001$), 7-м (на 14%, $p < 0,001$) и к 10-м суткам (на 24%, $p < 0,001$) при дозе ГНК 1,5 мкг/кг.

Пептид D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг снижал фагоцитарную активность на 10-е сутки (на 11%, $p < 0,001$). Однако его применение в дозе

1,5 мкг/кг к 3-м суткам вызывало увеличение данного показателя (на 12%, $p < 0,001$), а к 10-м суткам — достоверное снижение (на 14%, $p < 0,001$). При этом ФЧ в обеих использованных дозах пептида статистически значимо снижалась к 3-м суткам (на 43% и 38% соответственно при дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг). Завершенность фагоцитоза в этих подопытных группах также снижалась: при дозе 0,5 мкг/кг к 3-м (на 13%, $p < 0,001$), 7-м (на 12%, $p < 0,001$) и к 10-м суткам (на 17%, $p < 0,001$), а при дозе 1,5 мкг/кг — к 3-м (на 17%, $p < 0,001$) и к 10-м суткам (на 14%, $p < 0,001$).

Применение аналога трипептида GHK-D-Ala в обеих дозах приводило к росту ФИ в начале опыта и снижению к его окончанию. Так, при дозе 0,5 мкг/кг ФИ увеличивался на 3-и сутки (на 15%, $p < 0,001$), а на 10-е, напротив, снижался (на 14%, $p < 0,001$). В группе животных, получавших пептид в дозе 1,5 мкг/кг, ФИ увеличивался к 3-м (на 9%, $p < 0,01$) и 7-м суткам (на 8%, $p < 0,001$), и к 10-м (на 6%, $p < 0,05$). Значения ФЧ в обеих дозах достоверно снижались на 3-и и 7-е сутки эксперимента. Так, при дозе 0,5 мкг/кг ФЧ снижалось к 3-м суткам на 31% ($p < 0,001$) и на 22%, ($p < 0,01$) к 7-м, при дозе 1,5 мкг/кг на 50% ($p < 0,001$) к 3-м суткам и на 18% ($p < 0,001$) к 7-м. Завершенность фагоцитоза также преимущественно была низкой в обеих дозах, чем при использовании ГНК. В группе, получавшей GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг, отмечалось снижение данного показателя к 3-м (на 9%, $p < 0,001$), 7-м (на 12%, $p < 0,001$) и 10-м суткам (на 7%, $p < 0,001$). При дозе 1,5 мкг/кг завершенность фагоцитоза была снижена на 3-и (на 11%, $p < 0,001$) и 7-е сутки (на 10%, $p < 0,001$).

Полученные при изучении фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов данные позволили установить устойчивый эффект пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг на данный показатель. При этом на более ранних сроках заживления (3-и и 7-е сутки) отмечалось его увеличение, а на позднем этапе (10-е сутки) снижение относительно контрольных значений. Подобный характер динамики ФИ может являться следствием ускорения очищения раны за счет ранней активации фагоцитов. Также обращает внимание тот факт, что при использовании всех пептидов на всех сроках наблюдения имело место снижение значений ФЧ и завершенности фагоцитоза.

Изменение активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в спонтанном НСТ-тесте после введения ГНК в обеих использованных дозах не имело достоверных отличий в сравнении с контролем, за исключением угнетения данного показателя у животных, получавших ГНК в дозе 1,5 мкг/кг к 10-м суткам (на 46%, $p < 0,001$).

Таблица 1

Table 1

Динамика показателей врожденного иммунитета в крови экспериментальных животных при кожной ране и применении GHK, GHK-D-Ala и D-Ala-GHK ($M \pm SD$ / Me [Q1; Q3])

Dynamics of innate immunity indicators in experimental animal blood in skin wound and administration of GHK, GHK-D-Ala, and D-Ala-GHK ($M \pm SD$ / Me [Q1; Q3])

Группа Group	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7	10-е сутки Day 10
ФИ, % PI, %			
Контроль, n=10 Control, n=10	61.71 $\pm$ 3.55	64.60 $\pm$ 2.22	69.75 $\pm$ 2.05
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 μ g/kg, n=10	64.60 $\pm$ 2.22	60.40 $\pm$ 2.63*	69.00 $\pm$ 2.58
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 μ g/kg, n=10	60.22 $\pm$ 3.15	60.44 $\pm$ 3.13*	53.70 $\pm$ 2.11***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 μ g/kg, n=10	60.40 $\pm$ 2.63	64.00 $\pm$ 2.49	62.20 $\pm$ 3.71***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 μ g/kg, n=10	69.10 $\pm$ 3.07***	66.30 $\pm$ 3.80	60.00 $\pm$ 3.80***
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 μ g/kg, n=10	70.60 $\pm$ 1.96***	67.50 $\pm$ 2.99	60.30 $\pm$ 2.87***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 μ g/kg, n=10	67.30 $\pm$ 3.47**	69.60 $\pm$ 2.99**	65.5 [64.0; 67.0]*
ФЧ, в 1 фагоците PN, in 1 phagocyte			
Контроль, n=10 Control, n=10	7.29 $\pm$ 1.33	4.57 $\pm$ 1.33	3.88 $\pm$ 0.69
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 μ g/kg, n=10	4.57 $\pm$ 0.94***	4.17 $\pm$ 0.94	4.68 $\pm$ 0.30*
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 μ g/kg, n=10	3.41 $\pm$ 0.83***	3.85 $\pm$ 0.83	2.67 $\pm$ 0.57***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 μ g/kg, n=10	4.16 $\pm$ 0.63***	4.17 $\pm$ 0.63	3.27 $\pm$ 0.47
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 μ g/kg, n=10	4.50 $\pm$ 0.42***	5.30 $\pm$ 0.42	3.47 $\pm$ 0.63
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 μ g/kg, n=10	5.07 $\pm$ 0.81***	3.50 $\pm$ 0.81**	3.37 $\pm$ 0.74
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 μ g/kg, n=10	3.63 $\pm$ 0.48***	3.73 $\pm$ 0.48*	4.13 $\pm$ 0.71

Завершенность фагоцитоза, % Completeness of phagocytosis, %			
Контроль, n=10 Control, n=10	83.43 ± 4.69	75.50 ± 4.12	69.00 ± 2.14
ГНК 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 µg/kg, n=10	75.50 ± 4.12***	72.40 ± 3.10	68.60 ± 1.90
ГНК 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 µg/kg, n=10	65.33 ± 1.87***	65.33 ± 2.35***	52.00 [50.25; 53.75] ***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 µg/kg, n=10	72.40 ± 3.10***	66.20 ± 4.85***	57.30 ± 4.57***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 µg/kg, n=10	68.90 ± 2.38***	72.00 ± 2.94	59.40 ± 2.72***
ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 µg/kg, n=10	75.80 ± 2.49***	66.10 ± 3.03***	64.80 ± 2.49*
ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 µg/kg, n=10	74.00 ± 2.40***	67.70 ± 4.83***	71.88 ± 1.64
НСТ спонтанный Spontaneous NBT			
Контроль, n=10 Control, n=10	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.31 ± 0.02
ГНК 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 µg/kg, n=10	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.01
ГНК 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 µg/kg, n=10	0.23 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 µg/kg, n=10	0.20 ± 0.01	4.24 ± 0.60***	0.18 ± 0.60***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 µg/kg, n=10	4.33 ± 0.47***	2.66 ± 0.32***	0.19 ± 0.32***
ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 µg/kg, n=10	2.90 ± 0.41***	4.16 ± 0.50***	0.19 ± 0.50***
ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 µg/kg, n=10	3.91 ± 0.53***	3.80 [3.50; 4.05] ***	0.24 ± 0.55***

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контрольной группой, ** – p<0,01 по сравнению с контрольной группой, *** – p<0,001 по сравнению с контрольной группой

Note: * – p<0.05 as compared to Control group, ** – p<0.01 as compared to Control group, *** – p<0.001 as compared to Control group. PI – phagocytic index; PN – phagocytic number, NBT – nitroblue tetrazolium test.

а на позднем этапе (10-е сутки) снижение относительно контрольных значений. Подобный характер динамики ФИ может являться следствием ускорения очищения раны за счет ранней активации фагоцитов. Также обращает внимание тот факт, что при использовании всех пептидов на всех сроках наблюдения имело место снижение значений ФЧ и завершенности фагоцитоза.

Изменение активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в спонтанном НСТ-тесте после введения GHK в обеих использованных дозах не имело достоверных отличий в сравнении с контролем, за исключением угнетения данного показателя у животных, получавших GHK в дозе 1,5 мкг/кг к 10-м суткам (на 46%, $p<0,001$). Применение защищенного с N-конца аналога пептида D-Ala-GHK вызывало разнонаправленные изменения активности данных механизмов в обеих использованных дозах в разные отрезки времени. Так, при дозе 0,5 мкг/кг данный показатель на 3-и сутки сначала достоверно не изменялся, затем резко возрастал к 7-м суткам (на 1876%, $p<0,001$), а потом становился значимо сниженным по сравнению с контролем на 10-е сутки (на 41%, $p<0,001$). Введение животным этого аналога GHK в дозе 1,5 мкг/кг на 3-и и 7-е сутки приводило к достоверному повышению значений НСТ на 1593% ($p<0,001$) и 1140% ($p<0,001$) соответственно. Однако на 10-е сутки, как и при более низкой дозе, отмечалось снижение данного показателя (на 39%, $p<0,001$).

Изменение активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в НСТ-тесте после введения пептида GHK-D-Ala также не имело однозначного характера. Так, у животных, получавших данный аналог GHK в дозе 0,5 мкг/кг, на 3-и и 7-е сутки отмечалось существенное повышение показателей на 1052% ($p<0,001$) и 1813% ($p<0,001$) соответственно. Однако к 10-м суткам, напротив, происходило угнетение активности (на 39%, $p<0,001$). Схожим образом изменялись показатели в спонтанном НСТ-тесте и при дозе 1,5 мкг/кг, когда рост активности на 3-и сутки (на 1432%, $p<0,001$) и на 7-е сутки (на 1608%, $p<0,001$) сменялся достоверным снижением на 10-е сутки (на 23%, $p<0,001$).

Полученные данные об активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в определенной степени согласуются с показателями ФИ. В частности, на ранних сроках заживления (3-и и 7-е сутки) отмечалась их активация, а на 10-е сутки – ингибирование. При этом эффекты структурных аналогов, в отличие от GHK, проявлялись на протяжении всего эксперимента.

Трипептид GHK и его структурные аналоги также оказывали существенное влияние на процессы перекисного окисления и антиоксидантные механизмы (табл. 2). Установлено, что применение GHK в дозе 0,5 мкг/кг на 3-и сутки приводило к повышению активности каталазы (на 18%, $p<0,05$), однако к 7-м суткам активность фермента снижалась (на 26%, $p<0,001$), а к 10-м суткам вновь нарастала (на 29%, $p<0,001$). В дозе 1,5 мкг/кг отмечалась однонаправленная динамика изменений активности каталазы во все дни исследования, кроме 10-го – снижение к 3-м суткам (на 20%, $p<0,01$) и к 7-м суткам (на 41%, $p<0,001$). Использование пептида D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг способствовало снижению активности каталазы на (13%, $p<0,05$) к 3-м суткам, сменявшееся ростом данного показателя к 10-м суткам (на 27%, $p<0,05$). При дозе 1,5 мкг/кг активность каталазы сначала нарастала к 3-м суткам (на 19%, $p<0,01$), однако к 7-м суткам достоверно снижалась (на 25%, $p<0,001$). При введении пептида GHK -D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг активность каталазы нарастала на всех этапах наблюдения: на 26% ($p<0,001$) к 3-м, на 73% ($p<0,001$) к 7-м и на 50% ($p<0,001$) к 10-м суткам. Введение пептида в дозе 1,5 мкг/кг повышало активность каталазы на 3-и (на 16%, $p<0,05$) и на 7-е сутки (на 40%, $p<0,001$).

Наряду с влиянием на активность каталазы трипептид и его аналоги оказывали влияние и на общую антиоксидантную активность. Так, введение GHK животным в дозе 0,5 мкг/кг приводило к снижению ОАА на 3-и (на 13%, $p<0,001$) и 7-е сутки (на 8%, $p<0,05$), однако к 10-м суткам ОАА увеличивалась (на 37%, $p<0,001$). Применение пептида в дозе 1,5 мкг/кг способствовало стабильному снижению ОАА к 3-м суткам (на 21%, $p<0,001$), 7-м (на 14%, $p<0,001$) и 10-м суткам (на 32%, $p<0,001$). Пептид D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг также вызывал снижение ОАА на 3-и (на 19%, $p<0,001$), 7-е (на 42%, $p<0,001$) и 10-е сутки (на 43%, $p<0,001$). Аналогичная динамика изменений данного показателя отмечалась при использовании D-Ala-GHK в дозе 1,5 мкг/кг в виде снижения к 3-м (на 52%, $p<0,001$), 7-м (на 44%, $p<0,001$) и 10-м суткам (на 40%, $p<0,001$). Динамика изменений ОАА при введении пептида GHK -D-Ala в обеих использованных дозах была близкой к таковой у GHK и D-Ala-GHK. Так, после введения данного пептида в дозе 0,5 мкг/кг ОАА снижалась к 3-м (на 51%, $p<0,001$), 7-м суткам (на 36%, $p<0,001$) и 10-м суткам (на 25%, $p<0,001$). Введение GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг также вызывало снижение ОАА на 3-и сутки (на 44%, $p<0,001$), 7-е (на 45%, $p<0,001$) и 10-е сутки (на 16%, $p<0,001$).

Таблица 2

Table 2

Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в крови экспериментальных животных при кожной ране и применении GHK, GHK-D-Ala и D-Ala-GHK (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant activity indicators in experimental animal blood in skin wound and administration of GHK, GHK-D-Ala, and D-Ala-GHK (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Группа Group	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7	10-е сутки Day 10
МДА, мкмоль/л MDA, μmol/			
Контроль, n=10 Control, n=10	1.86 ± 0.22	1.26 ± 0.13	1.45 ± 0.11
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 μg/kg, n=10	1.26 ± 0.13***	2.15 ± 0.07***	1.40 ± 0.06
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 μg/kg, n=10	1.96 ± 0.08	2.60 ± 0.11***	4.27 ± 0.18***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 μg/kg, n=10	2.15 ± 0.07**	0.63 ± 0.13***	4.38 ± 0.86***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 μg/kg, n=10	0.56 ± 0.26***	0.34 ± 0.07***	4.06 ± 0.27***
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 μg/kg, n=10	0.21 ± 0.14***	0.64 ± 0.13***	2.87 ± 0.11***
АГП, усл. ед. AHP, conv. units			
Контроль, n=10 Control, n=10	0.27 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.32 ± 0.06
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 μg/kg, n=10	0.23 ± 0.06	0.29 ± 0.11	0.24 [0.22; 0.27]
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 μg/kg, n=10	0.51 [0.48; 0.61]***	0.97 ± 0.14***	1.40 ± 0.07***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 μg/kg, n=10	0.29 ± 0.11	0.26 ± 0.03	1.30 ± 0.17***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 μg/kg, n=10	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.03***	1.31 ± 0.20***
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 μg/kg, n=10	0.27 ± 0.03	0.20 [0.20; 0.21]	1.04 ± 0.07***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 μg/kg, n=10	0.30 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.64 ± 0.07***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 μg/kg, n=10	0.55 ± 0.22***	0.60 ± 0.12***	2.12 ± 0.08**

Группа Group	3-и сутки Day 3	7-е сутки Day 7	10-е сутки Day 10
Каталаза, Мкат/л Catalase, Mkat/l			
Контроль, n=10 Control, n=10	3.25 ± 0.24	3.84 ± 0.24	2.20 ± 0.08
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 µg/kg, n=10	3.84 ± 0.13***	2.85 ± 0.13***	2.84 ± 0.07***
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 µg/kg, n=10	2.61 ± 0.12***	2.28 ± 0.12***	2.00 ± 0.09
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 µg/kg, n=10	2.85 ± 0.38*	3.70 ± 0.38	2.78 ± 0.66***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 µg/kg, n=10	3.86 ± 0.36***	2.84 [2.58; 3.07] ***	2.50 ± 0.36
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 µg/kg, n=10	4.13 ± 0.89***	6.61 ± 0.89***	3.27 ± 0.12***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 µg/kg, n=10	3.77 ± 0.84**	5.38 ± 0.84***	2.16 ± 0.06
ОАА, % ТАА, %			
Контроль, n=10 Control, n=10	29.63 ± 2.19	25.89 ± 1.31	29.21 ± 2.07
GHK 0,5 мкг/кг, n=10 GHK 0.5 µg/kg, n=10	25.89 ± 1.31***	23.88 ± 1.93***	39.87 ± 2.32***
GHK 1,5 мкг/кг, n=10 GHK 1.5 µg/kg, n=10	23.56 ± 1.12***	22.34 ± 0.72***	19.82 ± 0.84***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 0.5 µg/kg, n=10	23.88 ± 1.93***	14.92 ± 1.74***	16.63 ± 1.84***
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг, n=10 D-Ala-GHK 1.5 µg/kg, n=10	14.30 ± 0.89***	14.52 ± 1.26***	17.58 ± 1.36***
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 0.5 µg/kg, n=10	14.72 ± 0.76***	16.39 ± 1.30***	21.94 ± 1.26***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг, n=10 GHK-D-Ala 1.5 µg/kg, n=10	16.71 ± 1.00***	14.36 ± 1.25***	24.58 ± 0.92***

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контрольной группой, ** – p<0,01 по сравнению с контрольной группой, *** – p<0,001 по сравнению с контрольной группой.

Note: * – p<0.05 as compared to Control group, ** – p<0.01 as compared to Control group, *** – p<0.001 as compared to Control group. MDA – malondialdehyde; AHP – acyl hydroperoxides; TAA – total antioxidant activity.

Наряду с изменением активности антиоксидантных механизмов на фоне использования пептидов в сыворотке крови изменялось содержание продуктов свободнорадикального окисления. Так, содержание МДА в сыворотке после введения GHK в дозе 0,5 мкг/кг снижалось на 3-и сутки (на 33%, $p<0,001$), повышалось на 7-е (на 72%, $p<0,001$) и не достигало достоверных различий на 10-е сутки. Введение животным GHK в дозе 1,5 мкг/кг вызывало достоверное повышение содержания МДА на 7-е (на 107%, $p<0,001$) и 10-е сутки (на 194%, $p<0,001$). При использовании аналога D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг отмечалось разнонаправленное изменение концентрации МДА: повышение на 3-и сутки (на 15%, $p<0,01$), снижение на 7-е (на 50%, $p<0,001$), снова увеличение к 10-м (на 202%, $p<0,001$). Динамика изменений содержания МДА после введения животным пептида D-Ala-GHK в дозе 1,5 мкг/кг на разных сроках наблюдения также имела разнонаправленный характер. Так, на 3-и и 7-е сутки концентрация снижалась (на 70% и 73% соответственно, $p<0,001$), а к 10-м, напротив, повышалась (на 179%, $p<0,001$). Сходный характер изменений уровней МДА наблюдался после введения аналога GHK-D-Ala в обеих дозах. При этом отмечалось их достоверное снижение к 3-м суткам при дозе 0,5 мкг/кг (на 89%, $p<0,001$) и 1,5 мкг/кг (на 71%, $p<0,001$), к 7-м суткам снижение содержания МДА сохранялось: на 48% ($p<0,001$) при дозе 0,5 мкг/кг и на 52% ($p<0,001$) при дозе 1,5 мкг/кг. На 10-е сутки, напротив, наблюдалось повышение концентрации МДА после введения пептида GHK-D-Ala в обеих дозах: на 97% ($p<0,001$) при меньшей дозе и на 46% ($p<0,001$) при большей.

Характер изменения содержания в сыворотке АГП значительно отличался от такового для МДА и его статистически значимые сдвиги на ранних сроках эксперимента наблюдались значительно реже. Так, после введения GHK в дозе 0,5 мкг/кг статистически значимых изменений концентрации АГП не было отмечено. Использование пептида в дозе 1,5 мкг/кг вызывало повышение данного показателя во все дни эксперимента: на 94% ($p<0,001$) на 3-и сутки, а к 7-м и 10-м данный показатель увеличивался в 3,3 раза ($p<0,001$). При применении аналога D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг способствовало достоверному росту концентрации АГП только на 10-е сутки (на 302%, $p<0,001$), при дозе 1,5 мкг/кг на 7-е (на 46%, $p<0,001$) и 10-е сутки (на 307%, $p<0,001$). Статистически значимое увеличение содержания АГП наблюдалось к 10-м суткам и при введении пептида GHK-D-Ala в обеих использованных дозах: на 221% ($p<0,001$) при меньшей и на 97% ($p<0,001$) при большей.

Установленный характер изменения активности процессов перекисного окисления и антиоксидантных механизмов свидетельствует о достаточно сложных по направленности и выраженности эффектах GHK и его аналогов, что требует их дальнейшего анализа и изучения.

При анализе механизмов выявленных эффектов необходимо отметить, что более выраженные эффекты структурных аналогов GHK могут быть обусловлены не только большей устойчивостью к разрушительному действию протеолитических ферментов, но и действием образующихся аминокислот в процессе протеолиза при деградации пептидной молекулы. Так, D-Ala способен поддерживать потенциал митохондриальной мембраны и препятствовать образованию активных форм кислорода, повреждающих клеточные структуры и нуклеиновые кислоты [18-20].

Также известно, что GHK при взаимодействии с ионами меди образует комплекс Gly-His-Lys-Cu (GHK-Cu), который активирует процессы пролиферации при раневых процессах в коже и положительный хемотаксис макрофагов в область повреждения [4, 21]. Кроме того, общеизвестным фактом является участие двухвалентных катионов меди в образовании гидроксильных радикалов, обладающих высокой активностью и играющих важную роль в кислородзависимых бактерицидных механизмах фагоцитирующих клеток. Данные механизмы во многом обеспечивают завершенность фагоцитоза, полноту очищения раны и эффективность ее заживления. Однако повышение образования активных форм кислорода, являющихся важными факторами развития вторичной алтерации в очаге воспаления, может сопровождаться высокой активацией перекисного окисления липидов и увеличением уровней малонового диальдегида и ацилгидроперекисей. Динамика изменения активности данных процессов и их соотношение могут иметь достаточно сложный характер, что и нашло отражение в результатах нашей работы. Поэтому важным интегративным показателем в оценке их биологического значения является ускорение регенеративных процессов после введения пептидов, установленное нами в предыдущем исследовании [11].

Таким образом, GHK и его структурные аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala при кожной инфицированной ране оказывают влияние на показатели врожденного иммунитета и перекисного окисления липидов в условиях кожной раны, выраженность и направленность которого зависит от срока заживления. При этом наиболее выраженные и устойчивые эффекты наблюдаются при использовании GHK-D-Ala, что сви-

детельствует о важности защиты молекулы трипептида от действия карбоксипептидаз.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все исследования проводили с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях; «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012) и в соответствии с решением регионального этического комитета при Курском государственном медицинском университете (протокол № 1 от 16.01.2014 г.).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Рахметова К.К. – сбор материала; разработка концепции и дизайна исследования; анализ и интерпретация данных; написание манускрипта; Бобынцев И.И. – разработка концепции и дизайна исследования; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания; окончательное утверждение для публикации рукописи; Бежин А.И. – разработка концепции и дизайна исследования; проверка критически важного интеллектуального содержания; Долгинцев М.Е. – анализ и интерпретация данных; написание манускрипта; проверка критически важного интеллектуального содержания; Ворвуль А.О. – статистическая обработка данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Башкина О.А., Сомотруева М.А., Ажикова А.К., Пахнова Л.Р. Нейроиммуноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже. *Медицинская иммунология*. 2019;21(5):807–820 [Bashkina OA, Samotrueva MA, Azhikova AK, Paknova LR. Neuroimmunoendocrine regulation of the skin functioning. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2019;21(5):807–820]. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820. EDN: XONLGS.
2. Makarevich P.I., Efimenko A.Y., Tkachuk V.A. 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. EDN: VJCNHF.
3. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*. 2020;98(3):165–177 [Khavinson V.Kh. Peptide medicines: past, present, future. *Clinical Medicine (Russian Journal)*. 2020;98(3):165–177 (in Russ.)]. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177. EDN: NZRQRF.
4. 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.
5. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., 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.
6. Siméon A., Emonard H., Hornebeck W., Maquart F.X. The tripeptidecopper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000;67(18):2257–2265. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1.
7. Siméon A., Wegrowski Y., Bontemps Y., Maquart F.X. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol*. 2000;115(6):962–968. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00166.x.
8. 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.
9. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., 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.
10. Ahmed M.R., Basha S.H., Gopinath D., Muthusamy R., Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst*. 2005;10(1):17–30. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10105.x.
11. Rakhmetova K.K., Mishina E.S., Vorvul A.O., Bobyntsev I.I., Dolgintsev M.E., Bezhin A.I. Regenerative effects of Gly-His-Lys and Gly-His-Lys-D-Ala peptides in infected skin wounds. *Bulletin of RSMU*. 2022;(2):58–64. DOI: 10.24075/brsmu.2022.014. EDN: WXBWVO.
12. Рагино Ю.И., Душкин М.И. Определение резистентности к окислению гепарин-осажденных b-липопротеинов сыворотки крови у больных ишемической болезнью сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1998;(11):3–5 [Ragino Yu.I., Dushkin M.I. Determination of resistance to oxidation of heparin-precipitated b-lipoproteins in blood serum in patients with coronary heart disease. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 1998;(11):3–5 (in Russ.)]. EDN: SJCQRH.
13. Королюк М.А., Иванова Л.К., Майорова И.Г., Токарева В.А. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988;(1):44–47 [Korolyuk M.A., Ivanova L.K., Mayorova I.G., Tokareva V.A. Method for determining catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988;(1):44–47 (in Russ.)]. EDN: SICVLT.
14. Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А., Молчанов А.В., Варшавский Б.Я. Состояние

- перекисного окисления у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1998;(6):10–14 [Galaktionova L.P., El'chaninova S.A., Molchanov A.V., Varshavskiy B.Ya. The state of peroxidation in patients with peptic ulcer of the stomach and duodenum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1998;(6):10–14 (in Russ.)]. EDN: XBPFOB.
15. Медведев А.Н., Маянский А.Н., Чаленко В.В. Способ исследования поглотительной фазы фагоцитоза. *Лабораторное дело*. 1991;(2):19–20 [Medvedev A.N., Mayanskiy A.N., Chalenko V.V. Method for studying the absorption phase of phagocytosis. *Laboratornoye delo*. 1991;(2):19–20 (in Russ.)]. EDN: ZAVONB.
 16. Щербakov В.И. Применение НСТ-теста для оценки чувствительности нейтрофилов к стимуляторам. *Лабораторное дело*. 1989;(1):30–33 [Shcherbakov V.I. Application of the NBT test to assess the sensitivity of neutrophils to stimulants. *Laboratornoye delo*. 1989;(1):30–33 (in Russ.)]. EDN: RUKUKR.
 17. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. URL: <https://www.R-project.org/>.
 18. Iwata Y., Nakade Y., Kitajima S., Yoneda-Nakagawa S., Oshima M., Sakai N., Ogura H., Sato K. et al. Protective effect of d-alanine against acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2022;322(6):F667–F679. DOI: 10.1152/ajprenal.00198.2021.
 19. Shi Y., Hussain Z., Zhao Y. Promising Application of D-Amino Acids toward Clinical Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10794. DOI: 10.3390/ijms231810794.
 20. Lee C.J., Qiu T.A., Sweedler J.V. d-Alanine: Distribution, origin, physiological relevance, and implications in disease. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2020;1868(11):140482. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140482..
 21. Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19(8): 969–988. DOI: 10.1163/156856208784909435.

Поступила в редакцию 30.12.2022

Подписана в печать 19.05.2023

Для цитирования: Рахметова К.К., Бобынцев И.И., Бежин А.И., Долгинцев М.Е., Ворвуль А.О. Эффекты пептида ГНК и его структурных аналогов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala на состояние врожденного иммунитета и перекисного окисления липидов в условиях кожной раны. *Человек и его здоровье*. 2023;26(1):33–44. DOI: 10.21626/vestnik/2023-1/05. EDN: VMMOSX

EFFECTS OF GHK PEPTIDE AND ITS STRUCTURE ANALOGUES, D-ALA-GHK AND GHK-D-ALA, ON INNATE IMMUNITY AND LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN SKIN WOUND

© Rakhmetova K.K., Bobyntsev I.I., Bezhin A.I., Dolgintsev M.E., Vorvul A.O.

Kursk State Medical University (KSMU)

3, K. Marx St., Kursk, Kursk region, 305041, Russian Federation

Objective: to study the effects of the GHK peptide and its structure analogues on the mechanisms of innate immunity and lipid peroxidation in wound.

Materials and methods. The experiments were performed on 70 male Wistar rats. The skin wound was modeled by applying a full-layer wound with an area of 250 mm² on the animal's back. The peptides Gly-His-Lys (GHK), D-Ala-Gly-His-Lys (D-Ala-GHK), and Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) were used in doses of 0.5 µg/kg and 1.5 µg/kg, which it was administered intradermally in doses of 0.5 µg/kg and 1.5 µg/kg in a volume of 0.1 ml for 3, 7 or 10 days. The activity of lipid peroxidation (LPO) processes in blood serum was assessed by the content of malonic dialdehyde (MDA) and acylhydroperoxides (AHP). The antioxidant mechanisms were evaluated by determining the activity of catalase and the total antioxidant activity (OAA) of blood serum. Phagocytic activity of blood neutrophils was assessed by phagocytic index (PI) and phagocytic number (PN). The activity of oxygen-dependent mechanisms in phagocytes was evaluated in a spontaneous nitroblue tetrazolium test (NBT).

Results. After the administration of GHK, the tendency to PI, PN and completeness of phagocytosis prevailed, which mainly persisted with the use of peptides D-Ala-GHK and GHK-D-Ala. At the same time, the GHK-D-Ala peptide at a dose of 1.5 µg/kg had the most stable effect on phagocytic activity. The data obtained in the NBT are largely consistent with the PN indicators. At the same time, the effects of structural analogues, unlike GHK, were manifested throughout the experiment. Significantly significant changes in the activity of LPO and antioxidant mechanisms were observed with the use of all peptides. However, their dynamics, orientation and severity throughout the experiment were quite complex.

Conclusion. GHK and its structural analogues, D-Ala-GHK and GHK-D-Ala, had an effect on the indicators of innate immunity and LPO in a skin wound, the severity and direction of which depends on the healing period. At the same time, the most pronounced and stable effects were observed when using GHK-D-Ala. That demonstrates the importance of protecting the tripeptide molecule from the action of carboxypeptidases.

Keywords: GHK; D-Ala-GHK; GHK-D-Ala; skin wound; phagocytosis; lipid peroxidation.

Rakhmetova Kamila K. – Part-Time Postgraduate Student of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-5511-5962. E-mail: muminovak@mail.ru

Bobyntsev Igor' I. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathophysiology, Head of the Research Institute of General Pathology, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-7745-2599. E-mail: bobig@mail.ru (corresponding author)

Bezhin Alexandr I. – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-3776-9449. E-mail: abezin@yandex.ru

Dolgintsev Maksim E. – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-0923-0166. E-mail: makdol@mail.ru

Vorvul Anton O. – Full-Time Postgraduate Student, Assistane lecturer at the Department of Pathophysiology, Junior Researcher at the Research Institute of General Pathology, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-1529-6014. E-mail: vorvul1996@mail.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

All studies were conducted in compliance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrates Used in Experimental Research; the Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicines (Moscow, 2012) and in accordance with the decision of the Regional Ethics Committee under Kursk State Medical University (Protocol No. 1 of 16.01.2014).

AUTHORS CONTRIBUTION

Rakhmetova K.K. – material collection; development of the research concept and design; analysis and interpretation of data; manuscript writing; Bobyntsev I.I. – development of the research concept and design, manuscript rationale, and critical intellectual content validation; final approval for publication of the manuscript; Bezhin A.I. – development of the research concept and design, critical intellectual content validation; Dolgintsev M.E. – analysis and interpretation of data; writing a manuscript; validation of critical intellectual content; Vorvul A.O. – statistical analysis of the data.

Received 30.12.2022

Accepted 19.05.2023

For citation: Rakhmetova K.K., Bobyntsev I.I., Bezhin A.I., Dolgintsev M.E., Vorvul A.O. Effects of GHK peptide and its structure analogues, D-Ala-GHK AND GHK-D-Ala, on innate immunity and lipid peroxidation processes in skin wound. *Humans and their health*. 2023;26(1):33–44. DOI: 10.21626/vestnik/2023-1/05. END: VM MOSX