

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА GHK-D-ALA НА МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЫ

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

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)

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

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов пептида GHK-D-Ala на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной раны.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 80 крысах-самцах Вистар. Инфицированную рану моделировали нанесением на спину полнослойной раны и проведением через 24 часа первичной хирургической обработки раны с наложением первичного шва. Пептид Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) вводили в дозе 0,5 мкг/кг в область раны каждый день в течение 30 суток. Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови проводили в спонтанном и стимулированном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП).

Результаты. Введение GHK-D-Ala оказывало положительное влияние в сравнении с контрольной группой как на механизмы фагоцитоза, так и на уровень продуктов ПОЛ. Отмечалось достоверное увеличение НСТ-положительных нейтрофилов в спонтанном тесте на фоне введения пептида на 3-и, 7-е, 10-е и 30-е сутки ($p < 0,001$), а в стимулированном НСТ-тесте на 3-и, 7-е и 10-е сутки ($p < 0,001$). Функциональный резерв нейтрофилов был достоверно увеличен к 10-м суткам ($p < 0,05$), а на 30-е сутки был значимо ниже ($p < 0,05$). Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число были значимо выше на 3-и и 10-е сутки ($p < 0,01$). Индекс активности фагоцитов достоверно увеличивался на 3-и и 10-е сутки ($p < 0,05-0,001$).

Продemonстрировано достоверное снижение концентрации МДА на 3-и, 7-е, 10-е и 30-е сутки ($p < 0,001$). Отмечено значимое снижение содержания АГП на 3-и, 7-е, 10-е и 30-е сутки ($p < 0,001$).

Заключение. Установлено корригирующее влияние пептида Gly-His-Lys-D-Ala на фагоцитарную активность гранулоцитов и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной кожной раны.

Ключевые слова: Gly-His-Lys-D-Ala; GHK-D-Ala; инфицированная рана; врожденный иммунитет; фагоцитоз; перекисное окисление липидов.

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

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

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

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

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

Белых Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры патофизиологии, ст. науч. сотрудник НИИ общей патологии, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-9766-2104. E-mail: a.e.belykh@gmail.com

В настоящее время для стимуляции регенерации при раневом процессе используются различные методы: магнитное, электрическое, лазерное излучение, а также лекарственные препараты общего и местного действия, применение трансплантатов [1, 6, 18]. При этом актуальным вопросом представляется изучение возможности использования регуляторных пептидов для воздействия на процессы регенерации при кожных ранах [7, 18, 19]. Выгодными преимуществами создания пептидных препаратов является их высокая эффективность в сравнительно низких дозах, удобство применения и практически полное отсутствие значительных

побочных эффектов и феноменов привыкания/отмены [7].

Известно, что регуляторные пептиды способны выступать модуляторами функций нервной, эндокринной, иммунной систем, а также могут участвовать в изменении процессов роста и дифференцировки клеток [2, 7, 12, 15]. Так, например, не вызывает сомнений, что клетки помимо гуморальных факторов (цитокины, факторы роста) образуют вторичные сигнальные мессенджеры из макромолекул экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). К подобным потенциальным активаторам образования и восстановления нормального состава ЭЦМ относится матричный трипептид глицил-гистидил-лизин

NH₂-Gly-L-His-L-Lys-COOH (GHK) [9, 18, 19]. Этот пептид обладает достаточно широким спектром биологической активности: модулирует процессы регенерации ткани, проявляет антиоксидантные, иммуностимулирующие, противовоспалительные и нейротропные свойства [11, 13, 16, 20].

Так, установлено, что при внутрибрюшинном введении пептид GHK в малых дозах способствовал заживлению эпидермальных повреждений [5, 20]. Ранозаживляющая активность этого трипептида в отношении срочных и замедленных процессов репаративной регенерации клеток кожи проявлялась в дозе 1,5 мкг/кг, не обладающей значимым влиянием на показатели врожденного иммунитета [5].

Модификация структуры GHK путем присоединения D-аланина к С- или N-концу может повышать ее устойчивость к действию протеолитических ферментов (аминопептидаз и карбоксипептидаз) и пролонгировать продолжительность и выраженность биологических эффектов.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов пептида GHK-D-Ala на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной раны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 80 крысах-самцах Вистар массой 180-240 г в возрасте 6-8 месяцев, разделенных на группы по 10 особей. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме, температуре 22±2 °С и относительной влажности воздуха в помещении 40-50%.

Инфицированную рану моделировали нанесением на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного полнослойной раны площадью 250 мм². На рану через 24 часа накладывали первичный шов с предварительным иссечением краев и дна инфицированной раны.

В работе использовали пептид Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala), представляющий собой защищенную с С-конца модификацию трипептида Gly-His-Lys (GHK), синтезированный в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета. Пептид растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрикожно (в двух точках вокруг раны, ежедневно меняя области введения по часовой стрелке на 90 градусов) в дозе 0,5 мкг/кг в 0,1 мл через 24 часа после моделирования инфицированной раны с последующим введением той же дозы препарата каж-

дые 24 часа на протяжении 30 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 обескровливания под эфирным наркозом, осуществляя забор крови из правого желудочка сердца на 3-и, 7-е, 10-е и 30-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 °С.

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, индекс активности фагоцитов (ИАФ) и завершенность фагоцитоза. Данные показатели вычисляли в мазках, окрашенных по Романовскому. Расчет производили на 100 нейтрофилов [3].

Активность кислородозависимых механизмов антиинфекционной защиты в фагоцитах оценивали в спонтанном и стимулированном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). В качестве стимулятора применяли зимозан. При микроскопии определяли количество клеток (в %), содержащих отложения диформаза, из расчета на 100 нейтрофилов. Функциональный резерв нейтрофилов рассчитывали как разность показателей стимулированного и спонтанного НСТ-теста [8].

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 [4].

Статистическую обработку проводили с использованием пакета прикладных программ MS Office Excel 2016 (Microsoft, USA) и программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера, оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене. В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа с последующим *post-hoc* анализом с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни соответственно. Для устранения эффекта множественных сравнений *p*-значения были скорректированы с помощью метода Бенджамини-Хохберга. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$. В зависимости от типа распределения данные представляли в виде медианы (Me), 25-го перцентиля (Q1) и 75-го перцентиля (Q3) или в виде среднего (M) и стандартного отклонения (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 часа после первичной хирургической обработки (ПХО) раны с наложением шва изменение активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в спонтанном НСТ-тесте после введения GHK-D-Ala было односторонним (табл. 1). Так, увеличение данного показателя было достоверным уже к 3-м суткам (на 54%, $p < 0,001$) и сохранялось на 7-е сутки (на 34%, $p < 0,001$) и 10-е сутки (на 13%, $p < 0,01$). На 30-е сутки показатели в спонтанном НСТ-тесте оставались выше значений контрольной группы (на 26%, $p < 0,01$).

Подобная направленность эффекта пептида отмечена и в стимулированном зимозаном НСТ-тесте (табл. 1). Изменения нарастали на 3-и сутки (на 57%, $p < 0,001$), оставаясь стабильно высокими на 7-е сутки (на 36%, $p < 0,001$) и 10-е сутки соответственно (на 21%, $p < 0,001$). При этом функциональный резерв нейтрофилов был достоверно увеличен к 10-м суткам (на 117%, $p < 0,05$), а на 30-е сутки, напротив, был значимо ниже в сравнении с показателями контрольной группы (на 64%, $p < 0,05$).

Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов после введения трипептида через 24 часа после ПХО раны с наложением шва также значимо нарастала, что отразилось в увеличении значений ФИ на 3-и сутки (на 12%, $p < 0,01$) и к 10-му дню (на 7%, $p < 0,01$). ИАФ

также был достоверно увеличен на 3-и сутки (на 68%, $p < 0,001$) и на 10-е сутки (на 23%, $p < 0,01$), что свидетельствовало о завершенности фагоцитарного процесса. Схожие изменения были отмечены также для ФЧ – увеличение на 3-и сутки (на 50%, $p < 0,001$) и 10-е сутки (на 14%, $p < 0,05$).

Как видно из таблицы 2, снижение концентрации МДА после применения GHK-D-Ala через 24 часа после ПХО раны с наложением шва отмечалось на 3-и сутки (на 51%, $p < 0,001$), к 7-м суткам снижение содержания МДА нарастало (на 64%, $p < 0,001$) и к 10-м суткам оставалось ниже значений контрольной группы (на 52%, $p < 0,001$). На 30-е сутки концентрация МДА также сохранялась ниже контрольных значений (на 53%, $p < 0,001$).

После введения трипептида через 24 часа после ПХО раны с наложением шва концентрация АГП была значимо ниже к 3-м суткам (на 43%, $p < 0,001$), и также оставалась стабильно низкой на 7-е сутки (на 51%, $p < 0,001$) и 10-е сутки (на 38%, $p < 0,001$). К 30-м суткам концентрация АГП также была статистически значимо ниже в сравнении с показателями контрольной группы (на 67%, $p < 0,001$).

На основании полученных результатов можно заключить, что пептид GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг оказывал выраженное влияние на процессы перекисного окисления. Отмечено протекторное действие трипептида на клеточные мембраны, что проявилось уменьшением концентрации МДА и АГП через 24 часа после ПХО раны с наложением шва.

Коррекция под действием модифицированного трипептида GHK-D-Ala показателей кислородзависимой бактерицидной активности нейтрофилов и показателей их фагоцитарной активности свидетельствует об усилении резервных возможностей неспецифических механизмов антиинфекционной защиты. Известно, что GHK способен вступать в комплекс с ионами меди, образуя Gly-His-Lys-Cu (GHK-Cu), и ускорять пролиферацию, предоставляя ионы Cu^{2+} для реализации многих клеточных функций [13, 16]. Так, имеются экспериментальные данные о влиянии GHK-Cu на стимуляцию регенерации кожи и ее сосудов при ранениях и других повреждениях [17]. Эффект GHK-Cu на положительный хемотаксис лимфоцитов и макрофагов в область повреждения также может способствовать ускорению заживления ран [14].

Доказано, что образование однородных упругих нитей коллагена связано с повышением уровня концентрации протеогликанов (биглюкина и декорина), а также гликозаминогликанов (дерматансульфата и хондроитинсульфата), который может быть достигнут,

Таблица 1

Table 1

Динамика изменения показателей врожденного иммунитета в крови животных при введении пептида GHK-D-Ala после ПХО раны с наложением шва (спустя 24 ч) (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Dynamics of changes in innate immunity indices in animal blood after administration of GHK-D-Ala peptide after wound repair with suturing (24 h later) (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Группа Group	3-и сутки 3 rd day	7-е сутки 7 th day	10-е сутки 10 th day	30-е сутки 30 th day
ФИ, % Phagocytic index, %				
Контроль (n = 10) Control	53.20 ± 4.57	63.60 ± 4.77	62.80 ± 2.04	67.70 ± 4.85
GHK-D-Ala (n = 10)	59.80 ± 3.26*	62.40 ± 3.78	68.00 [64.00; 69.75]*	65.10 ± 4.43
ФЧ, в 1 фагоците Phagocytic number, in 1 phagocyte				
Контроль (n = 10) Control	4.23 ± 1.02	4.86 ± 0.53	5.10 ± 0.69	6.23 ± 0.59
GHK-D-Ala (n = 10)	6.37 ± 0.75*	5.37 ± 0.79	6.00 [5.75; 6.00]*	5.87 ± 0.71
Завершенность фагоцитоза, % Completeness of phagocytosis, %				
Контроль (n = 10) Control	67.60 ± 4.67	67.30 ± 6.70	67.90 ± 3.25	65.50 ± 5.64
GHK-D-Ala (n = 10)	72.20 ± 5.41	69.70 ± 3.13	70.50 ± 3.14	68.70 ± 2.45
Индекс активности фагоцитов Phagocytes activity index				
Контроль (n = 10) Control	2.25 ± 0.59	3.10 ± 0.45	3.20 ± 0.45	4.22 ± 0.50
GHK-D-Ala (n = 10)	3.91 [3.79; 4.03]*	3.34 ± 0.46	3.93 ± 0.47*	3.82 ± 0.53
НСТ спонтанный Spontaneous NBT				
Контроль (n = 10) Control	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
GHK-D-Ala (n = 10)	0.26 ± 0.02*	0.25 ± 0.02*	0.23 [0.23; 0.25]*	0.24 [0.24; 0.29]*
НСТ стимулированный Stimulated NBT				
Контроль (n = 10) Control	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.04
GHK-D-Ala (n = 10)	0.28 ± 0.02*	0.30 ± 0.01*	0.28 ± 0.03*	0.28 [0.24; 0.31]
Функциональный резерв нейтрофилов Functional neutrophil reserve				
Контроль (n = 10) Control	0.01 ± 0.01	0.03 [0.02; 0.03]	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.04
GHK-D-Ala (n = 10)	0.02 [0.01; 0.03]	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.03*	0.01 [0.01; 0.02]*

Примечание: * – p<0,05-0,001 в сравнении с контрольной группой.

Note: * – p<0.05-0.001 in comparison with the control group. NBT – nitroblue tetrazolium test.

например, введением пептида GHK-Cu в область раны [14, 18]. Известно также, что GHK может корректировать перестройку структуры дермы, изменяя активность протеаз и их ингибиторов, а также стимулирует синтез коллагена, эластина и гликозаминогликанов внеклеточного кожного матрикса [10, 19, 20]. Защищенная с С-конца D-аланином от действия кабоксипептидаз, ос-

новная молекула GHK может оказывать влияние на течение ранозаживления путем ослабления процессов вторичной альтерации, которая является обязательным этапом воспалительной реакции, развивающейся при повреждении тканей. В очищении раны и механизмах пролиферации соединительной ткани участвуют нейтрофилы и макрофаги, активация процессов

Таблица 2

Table 2

Динамика изменений биохимических показателей крови животных при введении пептида GHK-D-Ala после ПХО раны с наложением шва (спустя 24 ч) (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Dynamics of changes in biochemical blood parameters of animals after administration of GHK-D-Ala peptide after wound repair with suturing (24 hours later) (M ± SD / Me [Q1; Q3])

Группа Group	3-и сутки 3 rd day	7-е сутки 7 th day	10-е сутки 10 th day	30-е сутки 30 th day
МДА, мкмоль/л MDA, μmol/l				
Контроль (n = 10) Control	3.46 ± 0.47	4.26 ± 0.57	2.72 ± 0.27	2.85 ± 0.28
GHK-D-Ala (n = 10)	1.68 ± 0.22*	1.49 [1.41; 1.60]*	1.31 ± 0.11*	1.35 ± 0.15*
АГП, усл. ед. AHP, conv. units				
Контроль (n = 10) Control	0.80 ± 0.21	0.88 ± 0.30	0.46 ± 0.05	1.01 ± 0.16
GHK-D-Ala (n = 10)	0.45 ± 0.14*	0.43 ± 0.10*	0.29 ± 0.07*	0.34 ± 0.09*

Примечание: * – p<0,05-0,001 в сравнении с контрольной группой.

Note: * – p<0.05-0.001 in comparison with the control group. MDA – malondialdehyde; AHP – acyl hydroperoxides.

свободнорадикального перекисного окисления в которых является одним из важнейших механизмов вторичной альтерации. В данном случае антиоксидантное действие трипептида может находиться в основе выявленного эффекта. Поскольку только скоординированные во времени и направленности реакции стромальных, иммунных и эндотелиальных клеток, а также воспалительных сигнальных путей лежат в основе эффективного закрытия раневого дефекта и ревакуляризации, обеспечивающих ранозаживление [21, 22].

Кроме того, при кожной ране действие GHK-D-Ala может быть обусловлено не только целой молекулой пептида, но и эффектами составляющих его аминокислот, образующихся в процессе протеолиза. Так, глицин может стимулировать кислородзависимые бактерицидные механизмы нейтрофилов, не оказывая влияния на репаративную регенерацию, при этом лизин способен повышать фагоцитарную активность нейтрофилов и также ускорять заживление кожных ран [5].

Таким образом, полученные результаты позволили установить корректирующее влияние пептида GHK-D-Ala на фагоцитарную активность гранулоцитов и процессы ПОЛ в условиях инфицированной кожной раны.

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; Долгинцев М.Е. – анализ и интерпретация данных; написание манускрипта; проверка критически важного интеллектуального содержания; 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; Ворвуль А.О. – написание манускрипта; Белых А.Е. – статистическая обработка данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Аралова М.В., Глухов А.А., Остроушко А.П. Кинетика раневого процесса при различных методах стимуляции регенерации в ранах. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*.

- 2018;11(3):173–178 [Aralova M.V., Glukhov A.A., Ostrotroushko A.P. Kinetics of Wound Process with Various Methods of Stimulation of Regeneration in Wounds. *Journal of experimental and clinical surgery*. 2018;11(3):173–178 (in Russ.)]. DOI: 10.18499/2070-478X-2018-11-3-173-178. URL: <https://vestnik-surgery.com/index.php/journal/article/view/1209>
2. Гомазков О.А. *Нейротрофические факторы мозга: справочно-информационное издание*. Электронная версия. Разделы 2–3. Москва: EBEWE Pharma, 2004. с. 89–178 [Gomazkov O.A. *Neurotrophic factors of the brain: a reference and informational publication*. Electronic version. Sections 2–3. Moscow: EBEWE Pharma, 2004. p. 89–178 (in Russ.)].
3. 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.)].
4. Рагино Ю.И., Душкин М.И. Определение резистентности к окислению гепарин-осажденных б-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.)].
5. Смахтин М.Ю., Курцева А.А., Чердаков В.Ю. Иммунорегуляторное и гепатотропное действие пептидов Gly-His-Lys, DSLET и АКТГ 4-10. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2006;14(3-1):223 [Smakhtin M.Yu., Kurtseva A.A., Cherdakov V.Yu. Immunoregulatory and hepatotropic effects of Gly-His-Lys, DSLET and ACTH 4-10 peptides. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2006;14(3-1):223 (in Russ.)].
6. Морозов А.М., Сергеев А.Н., Сергеев Н.А., Дубатолов Г.А., Рыжова Т.С., Пахомов М.А., Пельтихина О.В. Современные методы стимуляции процесса регенерации послеоперационных ран. *Сибирское медицинское обозрение*. 2020;(3):54-60 [Morozov A.M., Sergeev A.N., Sergeev N.A., Dubatolov G.A., Ryzhova T.S., Pakhomov M.A., Peltikhina O.V. Modern methods of stimulating process of postoperative wounds regeneration. *Siberian Medical Review*. 2020;(3):54-60 (in Russ.)]. DOI: 10.20333/2500136-2020-3-54-60
7. 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
8. 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.)].
9. Siméon A., Monier F., Emonard H., Gillery P., Birembaut P., Hornebeck W., Maquart F.X. Expression and activation of matrix metalloproteinases in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *J Invest Dermatol*. 1999;112(6):957–964. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00606.x
10. Hur G.H., Han S.C., Ryu A.R., Eom Y., Kim J.W., Lee M.Y. Effect of oligoarginine conjugation on the antiwrinkle activity and transdermal delivery of GHK peptide. *J Pept Sci*. 2020;26(2):e3234. DOI: 10.1002/psc.3234
11. 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
12. Kazemi A., Frazier T., Cave M. Micronutrient-related neurologic complications following bariatric surgery. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(4):288–295. DOI: 10.1007/s11894-010-0120-5
13. 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.
14. Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19(8):969–988. DOI: 10.1163/156856208784909435
15. Pickart L., Pickart E. A possible mechanism whereby skin remodeling may suppress cancer metastasis genes. *Wound Repair and Regeneration*. 2011;19(2):A42–A42.
16. 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
17. Pilgeram L. Control of fibrinogen biosynthesis: role of the FFA/albumin ratio. *Cardiovasc Eng*. 2010;10(2):78–83. DOI: 10.1007/s10558-010-9092-1
18. 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 J;19(7):1987. DOI: 10.3390/ijms19071987
19. 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
20. Siméon A., Emonard H., Hornebeck W., Maquart F.X. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000;67(18):2257–2265. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00803-1
21. Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):445–464. DOI: 10.1089/wound.2013.0473
22. Rowan M.P., Cancio L.C., Elster E.A., Burmeister D.M., Rose L.F., Natesan S., Chan R.K., Christy R.J.

Для цитирования: Рахметова К.К., Долгинцев М.Е., Бобынцев И.И., Бежин А.И., Ворвуль А.О., Бельх 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

EFFECT OF GHK-D-ALA PEPTIDE ON INNATE IMMUNITY MECHANISMS AND LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN INFECTED WOUNDS

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

Kursk State Medical University (KSMU)

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

The objective is to study the effects of Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) peptide on mechanisms of innate immunity and lipid peroxidation processes in infected wound.

Materials and methods. The experiments were carried out on 80 Wistar male rats. The infected wound was modeled by applying a full-layer wound on the back and performing primary wound surgery with primary suturing 24 hours later. GHK-D-Ala peptide was injected at a dose of 0.5 µg/kg into the wound area every day for 30 days. The phagocytic activity of blood neutrophils was studied in spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium reduction test (NBT-test). The activity of lipid peroxidation (LPO) processes in rats' blood serum was assessed by the content of malondialdehyde (MDA) and acylhydroperoxides (AHP).

Results. GHK-D-Ala administration had a positive effect on both phagocytosis mechanisms and the level of LPO products in comparison with the control group. There was a significant increase in NST-positive neutrophils in the spontaneous test against peptide administration on days 3, 7, 10, and 30 ($p < 0.001$) and in the stimulated NST test on days 3, 7, and 10 ($p < 0.001$). The functional neutrophil reserve had been significantly increased by day 10 ($p < 0.05$) and had been significantly lower by day 30 ($p < 0.05$). Phagocytic index and phagocytic number were significantly higher on days 3 and 10 ($p < 0.01$). The phagocyte activity index significantly increased on days 3 and 10 ($p < 0.05-0.001$). A significant decrease in the MDA concentration was demonstrated on days 3, 7, 10, and 30 ($p < 0.001$). There was a significant decrease in the content of AGP on days 3, 7, 10 and 30 ($p < 0.001$).

Conclusion. The corrective effect of Gly-His-Lys-D-Ala peptide on the phagocytic activity of granulocytes and the processes of lipid peroxidation in infected skin wounds was established.

Keywords: Gly-His-Lys-D-Ala; GHK-D-Ala; infected wound; innate immunity; 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

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

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

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

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

Belykh Andrey E. – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Senior Researcher of the Research Institute of General Pathology, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9766-2104. E-mail: a.e.belykh@gmail.com

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 Verte-

brates 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; Dolgintsev M.E. – analysis and interpretation of data; writing a manuscript; validation of critical

intellectual content; 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; Vorvul' A.O. – manuscript writing; Belykh A.E. – statistical analysis of the data.

Received 25.11.2020

Accepted 23.06.2021

For citation: Rakhmetova K.K., Dolgintsev M.E., Bobyntsev I.I., Bezhin A.I., Vorvul' A.O., Belykh A.E. 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