

УДК 617-001.4-002-085.36

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ471212>

Динамика заживления и изменение бактериальной обсемененности инфицированной раны при применении пептида ГНК и его структурных аналогов

К. К. Рахметова, И. И. Бобынцев, Л. В. Жилиева, А. И. Бежин, А. О. Ворвуль✉

Курский государственный медицинский университет, Курск, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. В настоящее время перспективным направлением представляется использование для ускорения раневого процесса трипептида $\text{NH}_2\text{-Gly-L-His-L-Lys-COOH}$ (ГНК), который действует на процессы регенерации ткани, обладает антиоксидантными, иммуностропными и противовоспалительными эффектами. При этом недостатком всех пептидов является их быстрая деградация протеолитическими ферментами. Одним из способов повышения устойчивости пептидных молекул является включение в их структуру D-изомеров аминокислот. Ранее нами было установлено, что ГНК-D-Ala оказывал более выраженное влияние на регенеративные процессы в ране, способствовал увеличению в ране количества клеток фибробластического ряда, макрофагов на фоне уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов, представлено существенное влияние D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala на показатели врожденного иммунитета и перекисного окисления липидов.

Цель. Оценить динамику заживления и бактериальной обсемененности инфицированной раны при применении пептида глицил-гистидил-лизин и его структурных модификаций с D-аланином (D-Ala).

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar. В работе использовали пептид ГНК и его структурные аналоги D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala; вводили внутривожно вокруг раны в дозах 0,5 мг/кг и 1,5 мг/кг каждые 24 ч. на протяжении 3, 7 или 10 сут. Оценивали площадь раны с расчетом коэффициента относительного ранозаживления (КОР), скорость заживления, сроки исчезновения перифокального отека, очищения раны, появления грануляций и начала краевой эпителизации. Бактериальную обсемененность определяли путем подсчета колоний на питательных средах после посева на них материала из биоптата раны.

Результаты. На 3 сут. КОР увеличился в 3,2–5,3 раза ($p < 0,05\text{--}0,01$) после использования пептидов D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala в обеих дозах при отсутствии эффекта после введения ГНК. На 7 сут. уменьшение площади раны достигло статистически значимых различий во всех подопытных группах. К 10 сут. также во всех группах использование пептидов вызвало уменьшение площади раны при наибольшей выраженности после введения пептида ГНК-D-Ala (93%, $p < 0,001$). На 7–10 сут. ГНК-D-Ala увеличил скорость заживления в 4,7–5,3 раза ($p < 0,05\text{--}0,01$) при отсутствии существенных изменений после введения ГНК и D-Ala-ГНК. Также ГНК-D-Ala в обеих дозах способствовал наиболее раннему исчезновению перифокального отека, очищению раны, появлению грануляций и началу краевой эпителизации. Значимое снижение бактериальной обсемененности наблюдалось после введения всех пептидов на 7 и 10 сут. при наибольшей выраженности после применения ГНК-D-Ala.

Заключение. В условиях инфицированной кожной раны применение пептида ГНК и его структурных аналогов D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala ускоряет ее заживление на фоне снижения бактериальной обсемененности. При этом наиболее выраженные изменения данных показателей отмечались после введения пептида ГНК-D-Ala, что указывает на важное значение защиты молекулы ГНК от действия карбоксипептидаз. Перспективным продолжением исследований в данном направлении может являться разработка местного средства с антибактериальным действием для стимуляции процессов регенерации в ране.

Ключевые слова: ГНК; D-аланин; регенерация; раневой процесс; бактериальная обсемененность; планиметрия

Для цитирования:

Рахметова К.К., Бобынцев И.И., Жилиева Л.В., Бежин А.И., Ворвуль А.О. Динамика заживления и изменение бактериальной обсемененности инфицированной раны при применении пептида ГНК и его структурных аналогов // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2024. Т. 32, № 4. С. 539–548. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ471212>

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ471212>

Effects of GHK Peptide and Its Structural Analogues on Dynamics of Healing and Bacterial Contamination of Infected Wound

Kamila K. Rakhmetova, Igor' I. Bobytsev, Lyudmila V. Zhilyayeva,
Aleksandr I. Bezhin, Anton O. Vorvul'[✉]

Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

ABSTRACT

INTRODUCTION: Currently, a promising trend to accelerate wound process seems to be the use of NH₂-Gly-L-His-L-Lys-COOH (GHK) tripeptide, which acts on the tissue regeneration, possesses antioxidant, immunotropic and anti-inflammatory effects. At the same time, the disadvantage of all peptides is their rapid degradation by proteolytic enzymes. One method to increase the stability of peptide molecules is the incorporation of D-isomers of amino acids in their structure. It was previously found by us that GHK-D-Ala produces a more marked effect on regenerative processes in the wound and facilitates increase in the number of fibroblast cells and macrophages in the wound with the underlying decrease in the number of granulocytes and lymphocytes; a significant effect of D-Ala-GHK and GHK-D-Ala on the parameters of the inborn immunity and lipid peroxidation was shown.

AIM: To evaluate the healing dynamics and bacterial contamination of an infected wound when using Glycyl-Histidyl-Lysine (GHK) peptide and its structural modifications with D-alanine (D-Ala).

MATERIALS AND METHODS: The experiments were conducted on Wistar rats. In the work, GHK peptide and its structural analogues D-Ala-GHK and GHK-D-Ala were used; they were administered intracutaneously around the wound at doses of 0.5 µg/kg and 1.5 µg/kg every 24 hours for 3rd, 7th and 10th days. The wound area with calculation of the relative wound healing coefficient (RWHC), the healing rate, the time of perifocal edema disappearance, wound cleansing, appearance of granulation and onset of marginal epithelialization were assessed. Bacterial contamination was determined by counting colonies on the nutrient media after inoculation of wound biopsy material on them.

RESULTS: On day 3rd, RWHC increased 3.2–5.3 times ($p < 0.05–0.01$) after the use of D-Ala-GHK and GHK-D-Ala peptides at both doses with no effect after the injection of GHK. On day 7th, the reduction of the wound area reached statistically significant differences in all experimental groups. By day 10th, the use of peptides resulted in decrease in the wound area most evident after the injection of GHK-D-Ala peptide (by 93%, $p < 0.001$) in all groups. On days 7th–10th, GHK-D-Ala increased the healing rate 4.7–5.3 times ($p < 0.05–0.01$) with no significant changes after the injection of GHK and D-Ala-GHK. Also, GHK-D-Ala at both doses resulted in the earliest disappearance of perifocal edema, wound cleansing, emergence of granulation and the onset of marginal epithelialization in all experimental groups. Significant reduction in bacterial contamination was observed after administration of all peptides on days 7th and 10th, being most pronounced after the use of GHK-D-Ala.

CONCLUSION: The application of GHK peptide and its structural analogues D-Ala-GHK and GHK-D-Ala in infected skin wounds accelerated wound healing against the background reduction of bacterial contamination. The most pronounced changes of these parameters were observed after administration of GHK-D-Ala peptide, which indicates the importance of protecting GHK molecule against the impact of carboxypeptidases. A promising continuation of the research in this direction can be the development of local means with antibacterial effect for stimulation of the regeneration processes in the wound.

Keywords: GHK; D-Alanine; regeneration; wound process; bacterial contamination; planimetry

For citation:

Rakhmetova KK, Bobytsev II, Zhilyayeva LV, Bezhin AI, Vorvul' AO. Effects of GHK Peptide and Its Structural Analogues on Dynamics of Healing and Bacterial Contamination of Infected Wound. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2024;32(4):539–548. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ471212>

Received: 31.05.2023

Accepted: 14.09.2023

Published: 31.12.2024

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GHK — Glycyl-Histidyl-Lysine (глицил-гистидил-лизин)

D-Ala — D-Alanine (D-аланин)

КОЕ — колониобразующая единица

КОР — коэффициент относительного ранозаживления

СЗ — скорость заживления

ВВЕДЕНИЕ

Повышение эффективности регенеративных механизмов при раневых процессах является актуальным направлением современных биомедицинских исследований. В настоящее время установлено, что основными последовательно развивающимися этапами регенерации при повреждениях тканей являются воспалительная реакция, заживление ран, ремоделирование внеклеточного матрикса, противовоспалительный и противofiброзный ответ, а также ремоделирование ткани [1–3]. Данные процессы обеспечиваются достаточно сложными и многообразными механизмами с участием всех регуляторных систем организма [4–6]. Одним из возможных путей реализации данной задачи может являться изучение пептидергических механизмов активации процессов заживления раны. В настоящее время накоплен значительный объем информации о применении пептидных молекул и созданных на их основе фармакологических препаратов в коррекции различных патологических процессов [6]. Поэтому достаточно перспективным представляется использование для ускорения разрешения раневого процесса трипептида глицил-гистидил-лизин (англ.: *Glycyl-Histidyl-Lysine*, GHK).

Известно, что данный пептид действует на процессы регенерации ткани [7, 8], а также обладает антиоксидантными, иммуностропными и противовоспалительными эффектами [9, 10]. При этом основным недостатком всех регуляторных пептидов является их быстрая деградация протеолитическими ферментами.

Одним из возможных способов повышения устойчивости пептидных молекул и, как следствие, увеличения продолжительности их биологического действия является включение в их структуру D-изомеров аминокислот. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что GHK-D-Ala (англ.: *D-Alanine*, D-Ala, D-аланин) оказывал более выраженное, чем GHK, влияние на регенеративные процессы в ране, способствовал увеличению в ране количества клеток фибробластического ряда, макрофагов на фоне уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов [10]. Также было представлено существенное влияние GHK и его структурных аналогов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala

при кожной инфицированной ране на показатели врожденного иммунитета и перекисного окисления липидов. Наиболее выраженные и устойчивые эффекты также наблюдались при использовании GHK-D-Ala [11]. Полученные в данных исследованиях результаты обусловили необходимость изучения на фоне применения влияния GHK и его структурных аналогов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala интегративных показателей заживления раны, используемых для клинической оценки эффективности регенеративных процессов.

Цель — оценить динамику заживления и бактериальной обсемененности инфицированной раны при применении пептида GHK и его структурных модификаций с D-Ala.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 150 крысах-самцах линии Wistar массой 180–240 г в возрасте 6–8 мес. (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Все подопытные группы включали по 10 крыс.

В работе использовали пептид GHK и его структурные аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala (синтезированы в Научно-исследовательском институте химии Санкт-Петербургского государственного университета), которые 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 мг/кг и 1,5 мг/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 сут. В контрольной серии животным в аналогичные промежутки времени вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Последнее введение препаратов осуществляли за 24 ч. до вывода животных из эксперимента.

Животных выводили из эксперимента путем забора крови из правого желудочка сердца под эфирным наркозом.

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).

Для создания модели инфицированной (естественное инфицирование) открытой раны на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного наносили полнослойные раны стандартного размера (250 мм²).

Сразу после моделирования раневого процесса, а также на первые, третьи, седьмые и десятые сутки раны фотографировали цифровой камерой Canon A410 с применением миллиметровой сетки с последующим измерением площадей ран на данных сроках контроля. Вычисление площадей ран производилось с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Для объективной планиметрической оценки заживления раны по изменению ее площади применяли коэффициент относительного ранозаживления (КОР) — выраженное в % уменьшение площади ран от исходного размера, который вычисляли по формуле:

$$КОР = (S_0 - S) / S_0 \times 100\%,$$

где S_0 — начальная, а S — конечная площадь раны (мм²) [12].

Также рассчитывали скорость заживления ран (уменьшения площади раны за сутки в %) по формуле:

$$СЗ = (КОР_1 - КОР_0) / T,$$

где $СЗ$ — скорость заживления, $КОР_1$ — коэффициент на момент измерения (конечный), $КОР_0$ — коэффициент при предыдущем измерении, T — количество дней между измерениями.

При визуальном осмотре оценивали клинические показатели заживления раны: сроки исчезновения перифокального отека, очищения раны, появления грануляций и начала краевой эпителизации.

Для количественного определения микробной обсемененности рану предварительно обрабатывали изотоническим раствором натрия хлорида, затем 70% этиловым спиртом с целью удаления с ее поверхности вегетирующей микрофлоры, гноя и детрита. Взятие материала производили после выведения животного из эксперимента в стерильном боксе иссечением участка ткани массой 0,1–0,5 г на всю глубину раны.

В дальнейшем биоптат взвешивали для вычисления коэффициента пересчета на 1 г ткани (K), готовили суспензию в изотоническом растворе натрия хлорида из расчета 1:10 и осуществляли посев 0,1 мл на плотную питательную среду (мясо-пептонный агар) по методу Дригальского. Посевы инкубировали в термостате (37°C) в течение 20 ч., затем сутки при комнатной температуре, после чего осуществляли подсчет колоний с учетом пересчета на 1 г ткани.

Подсчет колоний вели на чашках, в которых колонии росли изолированно и количество их не превышало 300. Количество микробов в 1 г ткани высчитывали по формуле:

$$N = n \times 10 \times 10 \text{ (или } \times 100, \text{ или } \times 1000) \times K,$$

где N — количество микробов в 1 г биоптата, n — количество микробов, выросших в чашке Петри, 10 — пересчет на 1 г суспензии, 10, 100 или 1000 — разведение засеянного материала на чашку Петри, с которой вели подсчет колоний, K — коэффициент пересчета навески на 1 г биоптата.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R ver. 4.1.0 [13] в интегрированной среде разработки RStudio Desktop ver. 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 данные представляли в виде «среднее ± стандартное отклонение» ($M \pm SD$), M и SD вычисляли с помощью функций `mean()` и `sd()` из стандартного пакета; при отклонении — в виде «Медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]» ($Me [Q1; Q3]$), которые вычисляли с использованием функций `median()` и `quantile()` из стандартного пакета. Для определения различий между группами применяли критерий Краскела–Уоллиса (функция `kruskal.test()` из стандартного пакета) с апостериорным тестом Данна с поправкой Бенджамини–Хохберга (функция `dunnTest()` из пакета `FSA`). Тест Данна проводился только при наличии значимых межгрупповых различий: p -значение для рассчитанного критерия Краскела–Уоллиса с 6 межгрупповыми степенями свободы и 70 — внутригрупповыми ($H_{6,70}$) было менее 0,05. Для него рассчитывались z -значение и степень его значимости (p -значение). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из таблицы 1, **на 3 сут.** во всех подопытных группах существенных различий в показателях площади раны и коэффициента ранозаживле-

ния в сравнении с контрольными животными не наблюдалось.

На **7 сут.** уменьшение площади раны достигало достоверно значимых различий во всех подопытных группах. Наиболее выраженные сдвиги при этом наблюдались после введения ГНК в дозах 0,5 (на 62%, $z = -4,53$, $p = 0,000005$) и 1,5 мкг/кг (на 56%, $z = -4,11$, $p = 0,00003$), а также D-Ala-ГНК в дозе 0,5 мкг/кг (на 60%, $z = -4,4$, $p = 0,00001$), что отразилось в достоверно значимом увеличении в данных группах коэффициента ранозаживления в 2,37 ($z = 3,78$, $p = 0,00015$), 2,17 ($z = 3,74$, $p = 0,00018$) и 1,94 ($z = 3,13$, $p = 0,0017$) раза соответственно. Увеличение данного показателя после введения ГНК-D-Ala не было статистически значимым. К **10 сут.** эксперимента во всех группах использование

пептидов сопровождалось существенным уменьшением площади раны. Наиболее выраженные различия относительно контрольных значений отмечались после введения пептида ГНК-D-Ala в дозах 0,5 (на 93%, $z = -5,91$, $p = 0,000000004$) и 1,5 мкг/кг (на 92%, $z = -5,33$, $p = 0,00000007$). После введения пептида D-Ala-ГНК снижение данного показателя было наименее выраженным: на 58% ($z = -2,19$, $p = 0,0028$) в дозе 0,5 мкг/кг и на 59% ($z = -2,03$, $p = 0,0042$) в дозе 1,5 мкг/кг. При этом обращает внимание отсутствие зависимости эффекта данных пептидов от использованной дозы. На фоне применения ГНК площадь раны была меньше контрольных значений после введения в дозах 0,5 мкг/кг (на 69%, $z = -2,91$, $p = 0,00036$) и 1,5 мкг/кг (на 83%, $z = -4,36$, $p = 0,000015$).

Таблица 1. Динамика изменений планиметрических показателей заживления раны ($n = 10$) при применении пептидов D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala, $M \pm SD/Me$ [Q1; Q3]

Группы	Срок			
	1 сутки	3 сутки	7 сутки	10 сутки
<i>Площадь раны, мм²</i>				
Контроль	250,00 [249,25; 250,00]	216,60 ± 39,88	165,50 ± 47,43	85,50 [72; 155,75]
ГНК 0,5 мкг/кг	250,00 [248,50; 250,00]	211,50 ± 63,93	63,40 ± 28,32***	26,50 [19,5; 29,00]**
ГНК 1,5 мкг/кг	249,00 [248,00; 250,00]	209,00 ± 35,05	72,60 ± 36,41***	14,50 [8,5; 23,25]***
D-Ala-ГНК 0,5 мкг/кг	249,50 [248,25; 250,00]	174,60 ± 28,78	66,60 ± 23,33***	36,00 [23,5; 43,50]*
D-Ala-ГНК 1,5 мкг/кг	250,00 [249,25; 250,00]	174,30 ± 37,85	97,10 ± 17,99***	35,50 [24,25; 59,25]*
ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	249,50 [248,00; 250,00]	169,00 ± 47,01	96,70 ± 34,08***	6,30 [5,1; 8,60]***
ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	249,50 [248,00; 250,00]	172,00 ± 47,86	113,80 ± 42,07**	7,20 [5,7; 16,00]***
Критерий Краскела-Уоллиса	$H_{6,70} = 2,71$, $p = 0,84$	$H_{6,70} = 12,47$, $p = 0,052$	$H_{6,70} = 32,96$, $p = 0,00001$	$H_{6,70} = 51,85$, $p = 0,00001$
<i>Коэффициент относительного ранозаживления, %</i>				
Контроль	0,40 [0,00; 0,79]	6,80 [2,30; 25,88]	21,32 ± 27,97	36,22 [14,02; 45,85]
ГНК 0,5 мкг/кг	0,20 [-0,30; 0,70]	17,56 [2,21; 35,27]	66,68 ± 21,11***	62,55 [33,68; 71,87]
ГНК 1,5 мкг/кг	0,40 [0,00; 0,80]	13,39 [10,18; 22,30]	65,21 ± 18,06***	77,98 [60,72; 86,80]**
D-Ala-ГНК 0,5 мкг/кг	0,40 [0,10; 0,70]	27,33 [20,42; 38,63]	59,79 ± 19,41***	48,17 [36,42; 55,03]
D-Ala-ГНК 1,5 мкг/кг	0,20 [0,00; 0,80]	25,74 [19,97; 39,93]	43,16 ± 9,00	61,57 [45,01; 74,50]
ГНК-D-Ala 0,5 мкг/кг	0,80 [0,10; 0,80]	36,97 [15,32; 45,22]	40,31 ± 24,89	92,00 [89,80; 94,59]***
ГНК-D-Ala 1,5 мкг/кг	0,80 [0,10; 1,09]	22,01 [19,27; 47,91]	33,04 ± 21,96	91,98 [89,79; 94,64]***
Критерий Краскела-Уоллиса	$H_{6,70} = 2,78$, $p = 0,83$	$H_{6,70} = 12,47$, $p = 0,052$	$H_{6,70} = 27,85$, $p = 0,00001$	$H_{6,70} = 47,39$, $p = 0,00003$

Примечания: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой (по апостериорному тесту Данна)

Скорость заживления ран у крыс, получавших ГНК, за 1–3 сут. существенно не отличалась от контрольной группы (табл. 2). На фоне введения D-Ala-GHK и GHK-D-Ala заживление в равной степени ускорялось, но не достигало статистически значимых различий. За период 3–7 сут. пептид ГНК в дозе 0,5 мкг/кг повышал скорость заживления в 2,7 раза ($z = 2,44$, $p = 0,015$), а в дозе 1,5 мкг/кг — в 1,4 раза ($z = 2,68$, $p = 0,007$). Однако на фоне введения GHK-D-Ala, напротив, отмечалась тенденция к снижению данного показателя без достижения

достаточно значимого уровня. Применение D-Ala-GHK сопровождалось разнонаправленными недостоверными изменениями в подопытных группах. На заключительном этапе эксперимента (7–10 сут.) на фоне введения GHK-D-Ala отмечено значительное ускорение заживления раны. Так, в дозе 0,5 мкг/кг пептид увеличивал данный процесс в 4,7 раза ($z = 2,57$, $p = 0,001$) и в 5,3 раза в дозе 1,5 мкг/кг ($z = 3,09$, $p = 0,0002$). При этом существенных изменений скорости заживления после введения ГНК и D-Ala-GHK не наблюдалось.

Таблица 2. Динамика скорости заживления раны ($n = 10$) при применении пептидов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala, $M \pm SD/Me$ [Q1; Q3], %

Группы	Срок		
	1–3 сутки	3–7 сутки	7–10 сутки
Контроль	6,43 ± 8,04	5,85 [-3,12; 8,19]	3,68 ± 8,15
ГНК 0,5 мкг/кг	7,52 ± 12,66	15,87 [3,64; 18,86]**	-5,10 ± 14,53
ГНК 1,5 мкг/кг	7,85 ± 7,27	14,20 [11,03; 15,38]***	2,83 ± 10,81
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг	14,64 ± 5,91	8,74 [6,36; 12,33]	-5,34 ± 12,78
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг	14,89 ± 7,91	4,54 [-1,91; 7,56]	5,62 ± 6,82
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	15,89 ± 9,61	3,90 [-5,54; 9,74]	17,24 ± 8,86*
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	15,16 ± 9,70	1,56 [-1,43; 6,70]	19,62 ± 7,63**
Критерий Краскела–Уоллиса	$H_{6,70} = 12,01$, $p = 0,0616$	$H_{6,70} = 20,04$, $p = 0,0027$	$H_{6,70} = 34,49$, $p = 0,00001$

Примечания: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой (по апостериорному тесту Данна)

Установленное повышение скорости заживления раны при введении GHK-D-Ala проявилось и в клинических показателях (табл. 3). Так, в обеих использованных дозах пептид способствовал наиболее раннему среди всех подопытных групп исчезновению перифокального отека, очищению раны, появлению грануляций

и началу краевой эпителизации. Эффекты ГНК и D-Ala-GHK при этом были менее выраженными и между ними не отмечалось существенных различий. Следует отметить, что при использовании всех пептидов изменения сроков проявления клинических показателей заживления раны имели достоверный характер.

Таблица 3. Динамика клинических показателей заживления раны ($n = 10$) при применении пептидов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala, $M \pm SD/Me$ [Q1; Q3]

Группы \ Показатели	Исчезновение перифокального отека, сутки	Очищение раны, сутки	Появление грануляций, сутки	Начало краевой эпителизации, сутки
Контроль	8 [8; 8,75]	9 [8,25; 9]	7 [7; 8]	9 [8; 9]
ГНК 0,5 мкг/кг	6 [5; 6]***	6 [6; 6]***	5 [5; 5]***	5 [5; 5]***
ГНК 1,5 мкг/кг	6 [6; 6]***	6,00 [6; 6,75]***	5 [5; 6]**	6 [5; 6]**
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг	6 [6; 7]*	7 [6; 7]*	5,50 [5; 6]*	6 [5; 6]**
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг	6 [6; 6]**	6 [6; 7]**	5 [5; 6]**	6 [5; 6]**
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	5 [4; 5]***	5 [4,25; 5]***	3 [3; 3,75]***	4 [3; 4]***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	4 [4; 5]***	5 [5; 5,75]***	4 [3; 4]***	5 [4; 5]***
Критерий Краскела–Уоллиса	$H_{6,70} = 56,85$, $p = 0,00001$	$H_{6,70} = 49,93$, $p = 0,00001$	$H_{6,70} = 56,97$, $p = 0,00001$	$H_{6,70} = 50,96$, $p = 0,00001$

Примечания: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой (по апостериорному тесту Данна)

Известно, что важную роль в процессе заживления инфицированной раны играют показатели микробной обсемененности. Как видно из таблицы 4, на 3 сут. данный показатель имел близкие значения во всех группах животных. Однако на 7 сут. его значения достоверно снижались после введения как ГНК, так и его аналогов. При этом наибольшее уменьшение микробной обсемененности (32%, $z = 2,64$, $p = 0,0017$) наблюдалось на фоне

применения ГНК-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. Подобный характер изменений данного показателя, но при еще большей выраженности, сохранился на 10 сут. эксперимента. Так, наибольшее уменьшение микробной обсемененности (37%, $z = 2,77$, $p = 0,0011$) также наблюдалось на фоне применения ГНК-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг, а наименее выраженный эффект отмечен после введения ГНК в аналогичной дозе (8%, $z = 1,56$, $p = 0,042$).

Таблица 4. Показатели микробной обсемененности раны ($n = 10$) при применении пептидов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala, $M \pm SD/Me$ [Q1; Q3], IgKOE/г аутоптата

Группы	Срок		
	3 сутки	7 сутки	10 сутки
Контроль	6,48 [6,47; 6,48]	5,98 ± 5,06	5,86 [5,79; 5,90]
ГНК 0,5 мкг/кг	6,48 [6,44; 6,48]	5,83 ± 5,23***	5,41 [5,30; 5,50] *
ГНК 1,5 мкг/кг	6,47 [6,46; 6,48]	5,33 ± 4,46***	4,28 [4,18; 4,37] ***
D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг	6,48 [6,44; 6,48]	5,44 ± 4,79***	4,30 [4,26; 4,34] *
D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг	6,47 [6,44; 6,48]	5,29 ± 4,24***	4,10 [4,01; 4,17] ***
GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	6,48 [6,47; 6,48]	4,08 ± 3,45***	3,68 [3,51; 3,83] ***
GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	6,47 [6,43; 6,48]	5,81 ± 4,94***	4,47 [4,33; 4,48] ***
Критерий Краскела–Уоллиса	$H_{6,70} = 2,78$, $p = 0,8355$	$H_{6,70} = 12,47$, $p = 0,032$	$H_{6,70} = 56,97$, $p = 0,00001$

Примечания: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой (по апостериорному тесту Данна); КОЕ — колониеобразующая единица

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, ГНК и его структурные аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala способствовали ускорению заживления раны и снижению ее бактериальной обсемененности. Следует отметить, что полученные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований и их сопоставление в значительной мере способствует выяснению механизмов выявленных эффектов. Известно, что двухвалентные катионы меди необходимы для образования гидроксильных радикалов, являющихся важным компонентом в кислородзависимых бактерицидных механизмах фагоцитирующих клеток. Полнота очищения раны от некротизированных элементов и микробов является основным условием эффективности репаративных процессов. Однако повышение образования активных форм кислорода, являющихся важными факторами развития вторичной альтерации в очаге воспаления, может сопровождаться высокой активацией перекисного окисления липидов и увеличением уровней малонового диальдегида и ацилгидроперекисей. При этом динамика изменения

активности данных процессов и их соотношение могут иметь достаточно сложный характер [11].

ГНК при взаимодействии с ионами меди образует комплекс ГНК-Cu, который активирует процессы пролиферации при раневых процессах в коже и положительный хемотаксис макрофагов в область повреждения [14–16]. Ранее нами на аналогичной экспериментальной модели кожной раны в те же сроки наблюдения было показано, что ГНК и GHK-D-Ala снижали число гранулоцитов и лимфоцитов и повышали число клеток фибробластического ряда, макрофагов и клеточный индекс при большей активности GHK-D-Ala [9]. Динамика данных морфометрических показателей, полученных при гистологическом изучении биоптата раны, могла находиться в основе изменений планиметрических показателей, установленных в настоящей работе. Ранее и более выраженное, чем в контрольной группе, снижение бактериальной обсемененности раны могло развиваться за счет более ранней активации процессов свободнорадикального окисления в фагоцитирующих клетках [10]. Вероятно, быстрое уменьшение данного показателя явилось причиной снижения на поздних сроках наблюдения

ряда показателей фагоцитарной активности, отмеченных ранее [10], вследствие полного очищения раны, что также способствовало положительной динамике интегративных планиметрических показателей заживления раны.

При этом достижение данного эффекта возможно и за счет антибактериального действия ГНК-Cu²⁺. В частности, такое действие показано при местном применении данных комплексов в виде наночастиц [17]. При этом в структуре молекулы ГНК-Cu²⁺ остается свободным С-конец [9, 16], что делает возможным присоединение D-Ala.

Повышение эффективности ГНК после его структурной модификации с применением D-Ala может быть обусловлено не только повышением устойчивости к действию протеаз, но и за счет действия образующихся при деградации пептидной молекулы аминокислот. В частности, D-Ala поддерживает потенциал митохондриальной мембраны и препятствует образованию активных форм кислорода, повреждающих клеточные структуры и нуклеиновые кислоты [18–20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно заключить, что в условиях инфицированной кожной раны применение пептида ГНК и его структурных аналогов D-Ala-ГНК и ГНК-D-Ala ускоряет ее заживление на фоне снижения бактериальной обсемененности. При этом наиболее выраженные изменения данных показателей отмечались после введения пептида ГНК-D-Ala, что указывает на важное значение защиты молекулы ГНК от действия карбоксипептидаз.

Перспективным продолжением исследований в данном направлении может являться разработка местного средства для стимуляции процессов регенерации в ране с антибактериальным действием на основе комплекса пептида ГНК-D-Ala и Cu²⁺ с его использованием в виде наночастиц.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: *Рахметова К. К.* — обработка материала, написание текста; *Бобынцев И. И.* — концепция и дизайн исследования, общее руководство, редактирование; *Жуляева Л. В.* — дизайн исследования, редактирование; *Бежин А. И.* — концепция и дизайн исследования, общее руководство; *Ворвуль А. О.* — обработка материала, написание текста. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Contribution of the authors: *K. K. Rakhmetova* — processing of material, writing the text; *I. I. Bobyntsev* — concept and design of study, general guidance, editing; *L. V. Zhilyayeva* — concept of study, editing; *A. I. Bezhin* — concept and design of study, general guidance, editing; *A. O. Vorvul'* — processing of material, writing the text. The authors confirm the correspondence of their authorship to the ICMJE International Criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Власова Т.И., Арсентьева Е.В., Спирина М.А., и др. Сигнальные пути и молекулярные маркеры эпидермальных стволовых клеток в процессе регенерации кожи // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022. Т. 66, № 2. С. 91–101. doi: [10.25557/0031-2991.2022.02.91-101](https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.91-101)
2. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis // Immunity. 2016. Vol. 44, No. 3. P. 450–462. doi: [10.1016/j.immuni.2016.02.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015)
3. Башкина О.А., Самотруева М.А., Ажикова А.К., и др. Нейроиммунноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 5. С. 807–820. doi: [10.15789/1563-0625-2019-5-807-820](https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-5-807-820)
4. Макаревич П.И., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины // Биохимия. 2020. Т. 85, № 1. С. 15–33. doi: [10.31857/S0320972520010029](https://doi.org/10.31857/S0320972520010029)
5. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее // Клиническая медицина. 2020. Т. 98, № 3. С. 165–177. doi: [10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177](https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177)
6. 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. Vol. 19, No. 7. P. 1987. doi: [10.3390/ijms19071987](https://doi.org/10.3390/ijms19071987)
7. 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. Vol. 2015. P. 648108. doi: [10.1155/2015/648108](https://doi.org/10.1155/2015/648108)
8. 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. Vol. 2012. P. 324832. doi: [10.1155/2012/324832](https://doi.org/10.1155/2012/324832)
9. Рахметова К.К., Мишина Е.С., Ворвуль А.О., и др. Регенеративные эффекты пептидов Gly-His-Lys и Gly-His-Lys-D-Ala при кожной инфицированной ране // Вестник РГМУ. 2022. № 2. С. 62–68. doi: [10.24075/vrgmu.2022.014](https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.014)

10. Рахметова К.К., Бобынцев И.И., Бежин А.И., и др. 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 // Человек и его здоровье. 2023. Т. 26, № 1. С. 33–44. doi: [10.21626/vestnik/2023-1/05](https://doi.org/10.21626/vestnik/2023-1/05)
11. Рисман Б.В., Зубарев П.Н. Современные методики оценки течения раневого процесса // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2020. Т. 39, № 3. С. 74–81. doi: [10.17816/rmmar64988](https://doi.org/10.17816/rmmar64988)
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Интернет]. Доступно по: <https://www.R-project.org/>. Ссылка активна на 31.05.2023.
13. Wang X., Liu B., Xu Q., et al. GHK-Cu-liposomes accelerate scald wound healing in mice by promoting cell proliferation and angiogenesis // Wound Repair Regen. 2017. Vol. 25, No. 2. P. 270–278. doi: [10.1111/wrr.12520](https://doi.org/10.1111/wrr.12520)
14. 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. Vol. 71, No. 6. P. 954–958.
15. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. GHK-Cu may Prevent Oxidative Stress in Skin by Regulating Copper and Modifying Expression of Numerous Antioxidant Genes // Cosmetics. 2015. Vol. 2, No. 3. P. 236–247. doi: [10.3390/cosmetics2030236](https://doi.org/10.3390/cosmetics2030236)
16. Sun L., Li A., Hu Y., et al. Self-Assembled Fluorescent and Antibacterial GHK-Cu Nanoparticles for Wound Healing Applications // Particle & Particle Systems Characterization. 2019. Vol. 36, No. 4. P. 1800420. doi: [10.1002/ppsc.201800420](https://doi.org/10.1002/ppsc.201800420)
17. Iwata Y., Nakade Y., Kitajima S., et al. Protective effect of d-alanine against acute kidney injury // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2022. Vol. 322, No. 6. P. F667–F679. doi: [10.1152/ajprenal.00198.2021](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00198.2021)
18. Shi Y., Hussain Z., Zhao Y. Promising Application of D-Amino Acids toward Clinical Therapy // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 18. P. 10794. doi: [10.3390/ijms231810794](https://doi.org/10.3390/ijms231810794)
19. 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. Vol. 1868, No. 11. P. 140482. doi: [10.1016/j.bbapap.2020.140482](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140482)

REFERENCES

1. Vlasova TI, Arsenteva EV, Spirina MA, et al. Signaling pathways and molecular markers of epidermal stem cells during regeneration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022;66(2):91–101. (In Russ). doi: [10.25557/0031-2991.2022.02.91-101](https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.91-101)
2. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450–62. doi: [10.1016/j.immuni.2016.02.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015)
3. Bashkina OA, Samotrujeva MA, Azhikova AK, et al. Neuro-immunoendocrine regulation of the skin functioning. *Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(5):807–20. (In Russ). doi: [10.15789/1563-0625-2019-5-807-820](https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-5-807-820)
4. Makarevich PI, Efimenko AYU, 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. (In Russ). doi: [10.1134/S0006297920010022](https://doi.org/10.1134/S0006297920010022)
5. Khavinson VKh. Peptide medicines: past, present, future. *Clinical Medicine (Russian Journal)*. 2020;98(3):165–77. (In Russ). doi: [10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177](https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177)
6. 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](https://doi.org/10.3390/ijms19071987)
7. 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](https://doi.org/10.1155/2015/648108)
8. 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](https://doi.org/10.1155/2012/324832)
9. Rakhmetova KK, Mishina ES, Vorvul AO, et al. Regenerative effects of Gly-His-Lys and Gly-His-Lys-D-Ala peptides in infected skin wounds. *Bulletin of RSMU*. 2022;(2):58–64. (In Russ). doi: [10.24075/vrgmu.2022.014](https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.014)
10. Rakhmetova KK, Bobyntsev II, Bezhin AI, et al. 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. (In Russ). doi: [10.21626/vestnik/2023-1/05](https://doi.org/10.21626/vestnik/2023-1/05)
11. Risman BV, Zubarev PN. Modern methods for evaluating the process of the wound process. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2020;39(3):74–81. (In Russ). doi: [10.17816/rmmar64988](https://doi.org/10.17816/rmmar64988)
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Available at: <https://www.r-project.org/>. Accessed: 2023 May 31.
13. Wang X, Liu B, Xu Q, 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](https://doi.org/10.1111/wrr.12520)
14. 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.
15. 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](https://doi.org/10.3390/cosmetics2030236)
16. Sun L, Li A, Hu Y, et al. Self-Assembled Fluorescent and Antibacterial GHK-Cu Nanoparticles for Wound Healing Applications. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2019;36(4):1800420. doi: [10.1002/ppsc.201800420](https://doi.org/10.1002/ppsc.201800420)
17. Iwata Y, Nakade Y, Kitajima S, et al. Protective effect of d-alanine against acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2022; 322(6):F667–79. doi: [10.1152/ajprenal.00198.2021](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00198.2021)
18. 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](https://doi.org/10.3390/ijms231810794)
19. Lee CJ, Qiu TA, Sweedler JV. 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](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140482)

ОБ АВТОРАХ

Рахметова Камила Камильджановна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5511-5962>;
eLibrary SPIN: 5852-8840; e-mail: muminovak@mail.ru

Бобынцев Игорь Иванович, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7745-2599>;
eLibrary SPIN: 3947-0114; e-mail: bobig@mail.ru

Жилыева Людмила Владимировна, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0390-4155>;
eLibrary SPIN: 1726-8119; e-mail: zhiljaevalv@kursksmu.net

Бежин Александр Иванович, д.м.н. профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-9449>;
eLibrary SPIN: 1250-5549; e-mail: bezhinai@kursksmu.net

*** Ворвуль Антон Олегович,** к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1529-6014>;
eLibrary SPIN: 8398-9376; e-mail: vorvulao@kursksmu.net

AUTHORS' INFO

Kamila K. Rakhmetova;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5511-5962>;
eLibrary SPIN: 5852-8840; e-mail: muminovak@mail.ru

Igor' I. Bobyntsev, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7745-2599>;
eLibrary SPIN: 3947-0114; e-mail: bobig@mail.ru

Lyudmila V. Zhilyayeva, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0390-4155>;
eLibrary SPIN: 1726-8119; e-mail: zhiljaevalv@kursksmu.net

Aleksandr I. Bezhin, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-9449>;
eLibrary SPIN: 1250-5549; e-mail: bezhinai@kursksmu.net

*** Anton O. Vorvul',** MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1529-6014>;
eLibrary SPIN: 8398-9376; e-mail: vorvulao@kursksmu.net

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author