

Рахметова Камила Камильджановна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ГЛИЦИЛ-ГИСТИДИЛ-
ЛИЗИНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ
КОЖНОЙ РАНЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.3. Патологическая физиология
(медицинские науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Бобынцев Игорь Иванович, доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Рыжак Галина Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, директор, заведующая отделом клинической геронтологии и гериатрии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии»;

Абдувосидов Хуршед Абдувохидович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой анатомии человека Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского по адресу: 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7 и на сайте <http://cfuv.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Е. Ю. Зяблицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения за последнее десятилетие ежегодно более 6 миллионов человек погибают от травм. При этом большую часть пострадавших составляют люди трудоспособного возраста. Причинами травматизма являются дорожно-транспортные происшествия, бытовой травматизм, военные конфликты. Все травмы, полученные вне операционных, являются первично инфицированными и нуждаются в первичной хирургической обработке (ПХО), поскольку в большинстве случаев имеют тенденцию к нагноению и генерализации воспалительного процесса. При этом гнойные раны составляют 30-35% в структуре больных общехирургических стационаров [В. В. Масляков и соавт., 2024]. Повышение эффективности регенеративных механизмов при раневых процессах является актуальным направлением современных биомедицинских исследований [Власова Т. И. и соавт., 2022].

В связи с этим представляется целесообразным изучение механизмов репаративных эффектов регуляторных пептидов, обладающих физиологической полифункциональностью и оказывающих влияние на процессы роста и дифференцировки клеток [М. А. Полянский, 2021; В. Х. Хавинсон, 2020]. При этом основным недостатком всех регуляторных пептидов является их быстрая деградация протеолитическими ферментами. В настоящее время накоплен значительный объем информации о применении пептидных молекул в коррекции различных патологических процессов [В. Н. Ковалева, 2025; С. Л. Тихонов, 2025; В. Х. Хавинсон, 2020]. В их числе — трипептид глицил-гистидил-лизин $\text{NH}_2\text{-Gly-L-His-L-Lys-COOH}$ (GHK) [L. Pickart, 2015; L. Pickart, 2018; A. Siméon, 2000] коллагенового происхождения, который наряду с влиянием на процессы регенерации ткани обладает антиоксидантными, иммуностропными, противовоспалительными и нейротропными эффектами [M. R. Ahmed, 2005; L. Mazurowska, 2008; L. Pickart, 2012; A. Siméon, 2000]. Ранее было показано ранозаживляющее действие GHK при кожных ранах, однако его выраженность была относительно невысокой [А. А. Курцева, 2008], вероятно, вследствие высокой протеолитической активности в ране.

Также актуальным представляется разработка способа ПХО инфицированных ран с использованием пептидных препаратов на основе механизмов их влияния на процессы регенерации с целью активации процессов ранозаживления.

Степень разработанности темы исследования. Перспективным направлением в стимуляции регенерации ран является использование пептидов [O. Garraud et al., 2017]. В настоящее время проводится значительное количество работ, посвященных исследованию роли пептидов в регуляции основных функций организма, в том числе на молекулярном уровне [A. C.-L. Lee et al., 2019]. Препараты пептидной природы обладают высокой эффективностью, отсутствием побочных эффектов, особенно аллергических реакций, возможностью применения в малых дозах. Дифференцировка стволовых клеток регулируется короткими пептидными цепочками, что, в свою очередь, может замедлять репликативное старение [В. Х. Хавинсон, 2020; L. Pickart et al., 2014; L. Pickart et al., 2015]. С учетом вышеизложенных фактов возможно сделать вывод о высокой

перспективности дальнейшего изучения и создания новых лекарственных средств на основе коротких пептидов.

Однако клиническое использование подобных препаратов ограничено ввиду короткого времени жизни *in vivo* в результате протеолитической деградации и недостатком информации о механизмах их действия. Поэтому перспективным направлением исследований является выяснение механизмов участия коротких пептидов тканевого происхождения с регенеративной активностью, в том числе их более устойчивых к протеолизу аналогов, в заживлении раны и обоснование их применения при данных патологических процессах.

Цель исследования – установить особенности регенерации инфицированной кожной раны в эксперименте, а также при её первичной хирургической обработке при использовании пептида Gly-His-Lys (GHK) и его структурных аналогов D-Ala-Gly-His-Lys (D-Ala-GHK) и Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala), основываясь на выявлении механизмов действия коротких пептидов.

Задачи исследования:

1. Провести планиметрическую оценку и установить изменение бактериальной обсемененности кожной инфицированной раны при использовании пептида GHK и его модификаций D-Ala-GHK и GHK-D-Ala.
2. Изучить морфологические и цитологические показатели регенерации инфицированной кожной раны при использовании пептида GHK и его модификаций D-Ala-GHK и GHK-D-Ala.
3. Исследовать действие пептида GHK и его модификаций D-Ala-GHK и GHK-D-Ala на активность фагоцитоза и систему перекисного окисления липидов на модели инфицированной кожной раны.
4. Исследовать динамику заживления, морфологические и цитологические показатели регенерации инфицированной кожной раны при ПХО в условиях применения пептида Gly-His-Lys-D-Ala.
5. Оценить активность фагоцитоза и систему перекисного окисления липидов при ПХО инфицированной кожной раны в условиях применения пептида Gly-His-Lys-D-Ala.

Научная новизна работы. Впервые проведена планиметрическая оценка кожной инфицированной раны при использовании пептидов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala и отмечено, что пептид GHK-D-Ala оказывает отчетливое воздействие на процессы регенерации в инфицированной кожной ране, приводя к достоверно значимому снижению числа гранулоцитов и лимфоцитов, увеличению числа клеток фибробластического ряда, макрофагов и клеточного индекса в сравнении как с группой контроля, так и с животными, которым вводили GHK в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг. Впервые изучено влияние модификаций пептида GHK, D-Ala-GHK и GHK-D-Ala, на активность фагоцитоза полиморфноядерных лейкоцитов, систему перекисного окисления липидов и бактериальную обсемененность на модели инфицированной кожной раны: форсируя и рационализируя фагоцитоз, а также ослабляя окислительный стресс в ране и вторичное повреждение тканей продуктами окисления, ускоряется очищение раны от микроорганизмов, что способствует переходу раневого процесса на этап регенерации.

Впервые исследованы эффекты присоединения пептида D-аланина к С-концу GHK при его применении при ПХО первично инфицированной кожной раны и

показано усиление фагоцитарной активности нейтрофилов и их кислородзависимых бактерицидных механизмов, ослабление воспалительной реакции и усиление регенеративных процессов в ране при увеличении числа клеток фибробластического ряда, макрофагов и уменьшения числа гранулоцитов на фоне активной контракции.

Впервые изучено влияние изменения структуры молекулы GHK путем присоединения D-аланина к С- или N-концу на противовоспалительную и регенераторную активность пептида: показано, что пептид новой структуры более устойчив к действию карбоксипептидаз, что продлевает регенераторное действие самого пептида и аминокислот, высвобождающихся после его распада.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате данного исследования были получены новые знания о противовоспалительной и регенераторной активности коротких пептидов коллагенового происхождения, что способствует расширению существующих представлений об участии пептидергических механизмов в патологических процессах. Показаны возможные механизмы их участия в течении раневого процесса за счет активации фагоцитоза, ослабления перексидации и усиления регенерации. Доказана наибольшая эффективность для регенераторной активности структурной модификации молекулы GHK путем присоединения D-аланина к С-концу (GHK-D-Ala), что свидетельствует о важной роли карбоксипептидаз в протеолитической деградации пептида. Полученные в работе данные о регенераторной активности пептида GHK-D-Ala на модели инфицированной кожной раны, а также при её ПХО, являются патогенетическим обоснованием для дальнейшей разработки путей стимуляции ранозаживления с использованием биологически активных пептидов.

По окончании проведенных экспериментов и исследований получены патенты «Способ стимуляции регенерации инфицированных ран кожи и мягких тканей с применением пептида Gly-His-Lys-D-Ala» (патент на изобретение № 2681216 от 05.03.19.) и «Способ первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей с использованием пептида Gly-His-Lys-D-Ala» (патент на изобретение № 2681310 от 06.03.19.)

Методология и методы исследования. Работа выполнена на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, кафедры патофизиологии и НИИ общей патологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ (ФГБОУ ВО КГМУ МЗРФ). Дизайн исследования включал изучение эффективности применения растворов пептидов при моделировании раневых повреждений у экспериментальных животных *in vivo* при их внутрикожном введении. Экспериментальные исследования проведены на 290 крысах-самцах Вистар в возрасте 6-8 месяцев массой 180-240 г согласно директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г., и были приняты региональным этическим комитетом при КГМУ (протокол № 1 от 16.01.2014 г.).

Для решения поставленных целей и задач был выполнен комплекс исследований, включающий: клиническую и планиметрическую оценку изменений раневого процесса; микробиологический метод (культуральный), цитологический

метод (с характеристикой типов цитогрaмм), гистологические методы (цифровая микрoфотосъёмка окрашенных срезов, световая микроскопия), биохимические методы (спектрофотометрия), иммунологические методы (анализ фагоцитарной активности, НСТ-тест), статистический метод.

Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Усиление регенеративных процессов в кожной инфицированной ране при применении GHK, D-Ala-GHK и GHK-D-Ala формируется за счет уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов наряду с увеличением числа клеток фибробластического ряда и макрофагов.

2. Пептиды GHK и его структурные аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala снижают степень выраженности воспалительной реакции в кожной инфицированной ране, в основе чего лежит действие на фагоцитарную и кислородзависимую бактерицидную активность лейкоцитов, а также систему перекисного окисления липидов.

3. Применение наиболее активного использованного пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг при ПХО инфицированной кожной раны способствовало ослаблению воспалительной реакции и выраженному усилению регенеративных процессов на фоне активной контракции.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Достоверность полученных данных, положений, выносимых на защиту, обоснование выводов и их соответствие задачам выполненного исследования обусловлены использованием достаточного числа экспериментальных животных, углубленным анализом большого количества источников современной литературы, использовании информативных микробиологических, гистологических, биохимических и иммунологических методов, современных методов статистической обработки согласно характеру полученных данных.

Основные результаты научной работы, положения и выводы диссертации были доложены и обсуждены на: Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2022); VIII Региональной научно-практической конференции «Павловские чтения 2022» (Курск, 2022); Международной конференции «Актуальные вопросы лечения ран мягких тканей» (Курск, 2022); IX Международной научно-практической конференции «Павловские чтения 2023» (Курск, 2023); Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2024 г.); I Евразийском конгрессе по патофизиологии (Москва, 2024); III Международной научно-практической конференции «От фундаментальных знаний к «тонкому владению скальпелем»» (Курск, 2024).

Проведена апробация данной научной работы на межкафедральном заседании кафедр патофизиологии, оперативной хирургии и топографической анатомии, гистологии, эмбриологии, цитологии; микробиологии, вирусологии, иммунологии; фармакологии, биологической химии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 20.03.2026 г.).

Публикации. В рамках проведенного исследования опубликовано 11 научных работ, отражающих главные теоретические положения, результаты и сформулированные выводы диссертации, из которых 5 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные

реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, эквивалентные им, в том числе 4 в журналах, включенных в базы данных Scopus, Chemical Abstracts, Springer, Web of Science. Получены 2 патента РФ на изобретение. Результаты диссертационного исследования в полном объеме отражены в публикациях.

Личный вклад автора. Соискателем самостоятельно проведен анализ данных литературы по теме исследования, лично выполнены моделирование инфицированной кожной раны у крыс, её ПХО, забор материала для последующего изучения, клиническая и планиметрическая оценка раневого процесса, определение фагоцитарной активности и бактерицидных механизмов лейкоцитов. Биохимические, патоморфологические и микробиологические исследования проводились при непосредственном участии автора. Автор лично проводил статистическую обработку полученных экспериментальных данных. Диссертант совместно с научным руководителем проводил анализ полученных данных, подготовку публикаций и заявок на регистрацию права на результаты интеллектуальной деятельности.

Структура и объём диссертации. Общий объём диссертации составляет 140 страниц машинописного текста, в состав которого входят вступительная часть, анализ данных литературы, описание материалов и использованных методик исследования, интерпретация полученных результатов, обсуждение результатов и заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы, который включает 270 источников (97 – отечественного издания и 173 зарубежных публикаций). Работа содержит 12 таблиц, иллюстрирована 13 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на базе кафедр патофизиологии, оперативной хирургии и топографической анатомии, НИИ общей патологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Эксперименты *in vivo* выполнены на 290 крысах-самцах Wistar в возрасте 6-8 месяцев массой 180-240 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Все животные внешних признаков заболеваний не имели и прошли карантинный режим вивария КГМУ. В работе исследовали пептиды, синтезированные в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета: глицил-гистидил-лизин (Gly-His-Lys (GHK)), глицил-гистидил-лизил-D-аланин (Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala)) и D-аланил-глицил-гистидил-лизин (D-Ala-Gly-His-Lys (D-Ala-GHK)).

Подопытные животные были распределены на I этапе на 7 групп по 10 особей в каждой: контрольная группа с внутрикожным введением физиологического раствора ($n=30$), а также 6 групп с использованием пептидов GHK, D-Ala-GHK, GHK-D-Ala. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили крысам ($n=180$) внутрикожно (в двух точках вокруг раны, ежедневно меняя области введения по часовой стрелке на 90°) в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг в 0,1 мл через 24 часа

после моделирования инфицированной раны с последующим введением той же дозы препарата каждые 24 часа на протяжении 3, 7 или 10 суток. Последнее введение препаратов осуществляли за 24 часа до вывода животных из эксперимента.

На II этапе эксперимента (2 группы животных, ($n=80$) проводилась ПХО раны с иссечением краев и дна спустя 24 часа от её нанесения, с последующим её ушиванием, совмещенное с внутрикожным введением физиологического раствора в контрольной группе, или введением трипептида GHK-D-Ala в концентрации 0,5 мкг/кг – во второй группе. Сроки наблюдения соответствовали 3, 7, 10 и 30 суткам.

Инфицированную открытую рану (естественное инфицирование) моделировали нанесением на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного полнослойной раны площадью 250 мм² (1,5x1,5 см). Сразу после нанесения экспериментальной раны, а также на 1, 3, 7 и 10 сутки были выполнены фотографии ран при помощи цифровой камеры Canon A410 с использованием миллиметровой сетки дальнейшим измерением площадей ран на указанных сроках контроля. Измерение площадей ран выполнялось с применением программы Image Tool. Оценку клинических признаков течения раневого процесса и его стадийности производили путем наблюдения за состоянием раны и регистрации сроков её очищения, купирования отека окружающих тканей, возникновения грануляций, старта краевой эпителизации и полного заживления. С целью объективизации данных, полученных при измерении площади ран (мм²) и скорости их заживления нами рассчитывался коэффициент относительного ранозаживления (КОР), выраженный в % [А. Н. Герасимов, 2007]. При цитологической оценке раневого процесса использовался «метод отпечатков» [М. И. Кузин и соавт., 1990]. Мазки фиксировали смесью Никифорова (спирт-эфирный раствор) и окрашивали по способу Романовского-Гимзе. При последующей микроскопии мазков-отпечатков осуществлялся подсчет 100 клеток, клеточный состав демонстрировали в процентах.

Гистологическая оценка раневых аутоплатов на первом этапе эксперимента выполнялась после выведения животных на 3-и, 7-е и 10-е сутки. Для морфологического исследования иссекали участок раны с прилежащей интактной кожей, фиксировали в формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Впоследствии с парафиновых блоков делали срезы толщиной 7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое изучение гистологических препаратов проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nikon; Япония) со штатной цифровой цветной камерой. Подсчет числа гранулоцитов, лимфоцитов, макрофагов, клеток фибробластического ряда (ФБР) осуществлялся при увеличении $\times 400$ на 100 клеток. Полученные цифры выражали в процентах. Далее высчитывали клеточный индекс (КИ) для уточнения стадии раневого процесса и степени выраженности регенерации [А. Ю. Григорьян и соавт., 2021]. Для количественного определения микробной обсемененности вели подсчет колоний с учетом пересчета на 1 г ткани.

Для изучения фагоцитарной активности нейтрофилов крови применяли фагоцитарный индекс (ФИ) – количество нейтрофилов на 100 клеток, которые принимают участие в фагоцитозе, фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество микробов, которые поглотил один фагоцит, завершенность фагоцитоза. Данные

показатели вычисляли в мазках, окрашенных по Романовскому [Медведев А. Н., 1991]. Математически для объективной оценки фагоцитоза рассчитывали индекс активности фагоцитов (ИАФ) [М. Ю. Смахтин и соавт., 2019]. Активность кислородзависимых механизмов антиинфекционной защиты в фагоцитах оценивали в спонтанном и стимулированном тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [В. Н. Park et al., 1968]. В качестве стимулятора применялся зимозан. При микроскопии определяли количество клеток (в %), содержащих отложения диформаза, из расчета на 100 нейтрофилов [В. И. Щербаков, 1989]. Функциональный резерв нейтрофилов рассчитывали как разность показателей стимулированного и спонтанного НСТ-теста [М. Е. Виксман, 1977]. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови определяли по количественному содержанию в сыворотке крови малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП), которые регистрировали при помощи спектрофотометра «Ape1 330 PD» (Япония). Результаты МДА указывали в мкмоль/л [Ю. И. Рагино и соавт., 1998]. Количество АГП выражалось в условных единицах [Н. М. Орёл, 2019]. Оценку антиоксидантных механизмов производили путем определения активности каталазы и общей антиокислительной активности (ОАА) сыворотки крови. Активность каталазы измеряли в мккат/л и определяли при помощи спектрофотометра «Ape1 330 PD» (Япония) [В. С. Королюк и соавт., 1988]. Для подсчета концентрации ОАА использовали метод, основанный на установлении степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА [Л. П. Галактионова и соавт., 1998; В. С. Камышников, 2003].

Статистический анализ проводили с MS Office Excel 2016 (Microsoft Corp.) и программной среды вычислений R v.4.1.0 [229] в интегрированной среде разработки RStudio Desktop v. 1.4.1717 (RStudio, PBC; США). Для отслеживания нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка, а равенства дисперсий — критерий Левене. Если гипотезы для сравнения двух групп подтверждались, то применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Данетта, данные представляли в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение» ($M \pm SD$). Для устранения эффекта множественных сравнений р-значения были скорректированы с помощью метода Бенджамини—Хохберга. При отклонении применяли критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, результаты выражены в виде «Медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]» ($Me[1Q; 3Q]$). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Установлено, что к 10-м суткам эксперимента применение пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг сопровождалось достоверным уменьшением площади раны и коэффициента относительного ранозаживления (таблица 1).

Подобная динамика также проявилась в клинических показателях и в цитологической картине мазков-отпечатков. Так, в обеих использованных дозах пептид GHK-D-Ala способствовал наиболее раннему среди всех подопытных групп купированию отека окружающих тканей, очищению раны, возникновению грануляций и старту краевой эпителизации.

Таблица 1 – Изменение планиметрических показателей заживления раны при применении пептидов GHK, D-Ala-GHK и GHK-D-Ala ($M \pm SD$ / Me [1Q; 3Q], $n = 10$)

Группа (мкг/кг)	Срок		Коэффициент относительного ранозаживления (%)
	Площадь раны (мм ²)		
	1-е сутки	10-е сутки	10-е сутки
Контроль	250,00 [249,25; 250,00]	85,50 [72; 155,75]	36,22 [14,02; 45,85]
GHK 0,5	250,00 [248,5; 250,00]	26,50 [19,5; 29,00]**	62,55 [33,68; 71,87]
GHK 1,5	249,00 [248; 250,00]	14,50 [8,5; 23,25]***	77,98 [60,72; 86,80]**
D-Ala-GHK 0,5	249,50 [248,25; 250,00]	36,00 [23,5; 43,50]*	48,17 [36,42; 55,03]
D-Ala-GHK 1,5	250,00 [249,25; 250,00]	35,50 [24,25; 59,25]*	61,57 [45,01; 74,50]
GHK-D-Ala 0,5	249,50 [248; 250,00]	6,30 [5,1; 8,60]***	92,00 [89,80; 94,59]***
GHK-D-Ala 1,5	249,50 [248; 250,00]	7,20 [5,7; 16,00]***	91,98 [89,79; 94,64]***

Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой (по критерию с Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна)

На 3-и сутки показатель микробной обсемененности имел близкие значения во всех группах животных. Однако на 7-е сутки его значения достоверно снижались как после введения GHK, так и его аналогов. При этом наибольшее уменьшение микробной обсемененности (на 32%, $p < 0,001$) наблюдалось на фоне применения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. Подобный характер изменений данного показателя сохранился на 10-е сутки эксперимента (на 37%, $p < 0,001$).

На 10-е сутки в контрольной группе продолжают преобладать воспалительные изменения. Сохраняется лимфоцитарная инфильтрация на фоне утолщения базального слоя эпидермиса на границе с дефектом и клеточного детрита на поверхности раны (рис. 1-А). В группе с введением GHK в дозе 0,5 мкг/кг (рис. 1-Б) и 1,5 мкг/кг (рис. 1-Г) лейкоцитарно-некротический слой регистрируется лишь в центральной зоне раневого дефекта. Незначительные признаки отека. Формируется молодая соединительная ткань с расширенными капиллярами. Преобладают клетки ФБР. В группе GHK 0,5 мкг/кг эпителий имеет

нарушенную стратификацию, в дозе 1,5 мкг/кг – эпителий оформленный, за исключением рогового слоя. В группе с применением пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой не определяется (рис. 1-В), а в дозе 1,5 мкг/кг он присутствует локально (рис. 1-Д). Нижележащая молодая соединительная ткань богата обескровленными расширенными капиллярами. В поле зрения преобладают клетки ФБР. Заметно прорастание эпителиального лоскута на поверхности грануляционной ткани. На отдельных срезах обнаружено полное покрытие дефекта эпителием в группе с введением пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. При введении пептида D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг (рис. 1-Е) и в дозе 1,5 мкг/кг (рис. 1-Ж) на 10-е сутки лейкоцитарно-некротический слой минимальных размеров, меньше содержит некротических масс, но больше лейкоцитов. В более глубоких слоях соединительная ткань приобретает более сформированный вид по клеточному составу и по виду и качеству волокон. Прорастание эпителиального лоскута незначительно, по размеру меньше в обеих группах, чем в контроле.

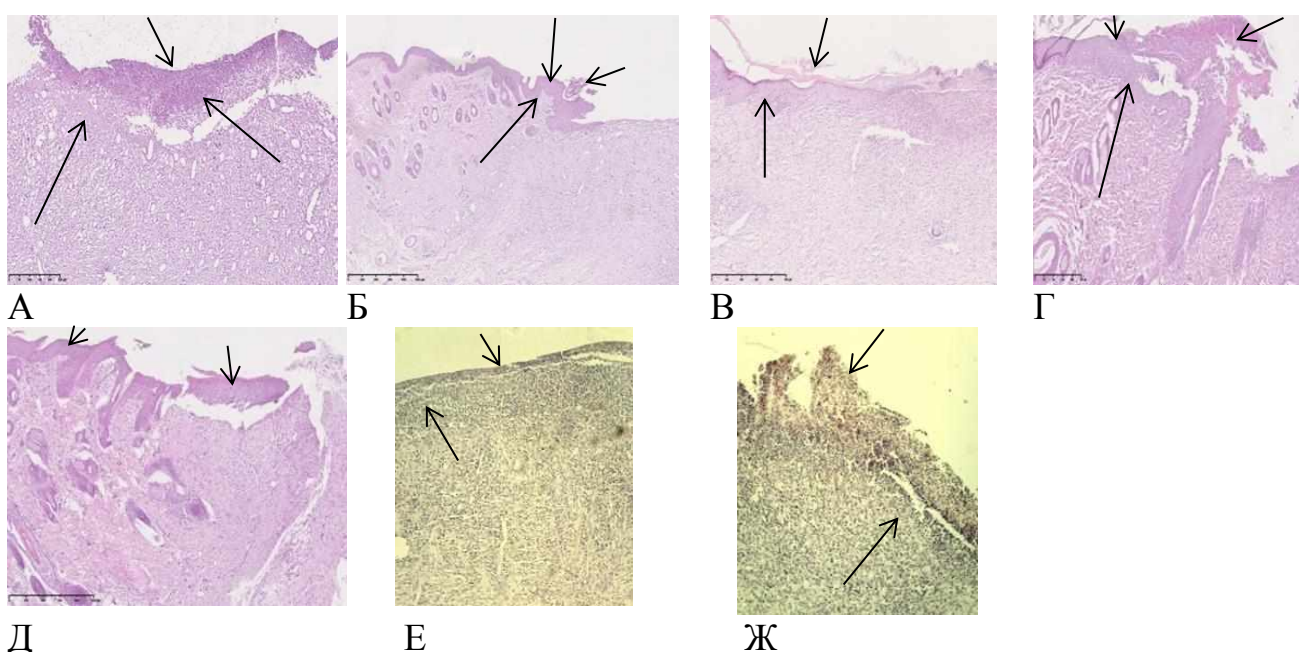


Рисунок 1 – Микрофотографии фрагментов кожи на месте раны на 10-е сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином; ув. $\times 10$).

А. Контроль. Клеточный детрит. Лимфоцитарная инфильтрация. Зрелая соединительная ткань. Б. GHK в дозе 0,5 мкг/кг. Лимфоцитарная инфильтрация. Зрелая соединительная ткань. Эпителий. В. GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. Зрелая соединительная ткань. Эпителий. Г. GHK в дозе 1,5 мкг/кг. Лимфоцитарная инфильтрация. Зрелая соединительная ткань. Эпителий. Д. GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг. Лимфоцитарная инфильтрация. Эпителий. Е. D-Ala-GHK в дозе 0,5 мкг/кг. Лимфоцитарная инфильтрация. Зрелая соединительная ткань. Ж. D-Ala-GHK в дозе 1,5 мкг/кг. Лимфоцитарная инфильтрация. Зрелая соединительная ткань.

Морфологическая оценка течения раневого процесса также подтверждает регенераторный характер изменений в экспериментальных группах по сравнению с группой контроля на всех сроках наблюдения. Миграция клеток ФБР в место повреждения преобладала на всех сроках эксперимента в группе введения GHK-D-

Ala в дозе 0,5 мкг/кг в сравнении с группой контроля и с экспериментальными животными, которым вводили GHK и D-Ala-GHK (рисунок 2). Количество макрофагов в группе с введением GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на всех сроках наблюдения было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05 - 0,001$), а на 3-и и 10-е сутки — и в сравнении с животными, получавшими GHK и D-Ala-GHK. После введения пептидов в дозе 1,5 мкг/кг во всех группах по сравнению с контрольными животными происходило достоверное увеличение числа макрофагов при большей выраженности эффекта при использовании GHK ($p < 0,05 - 0,001$).

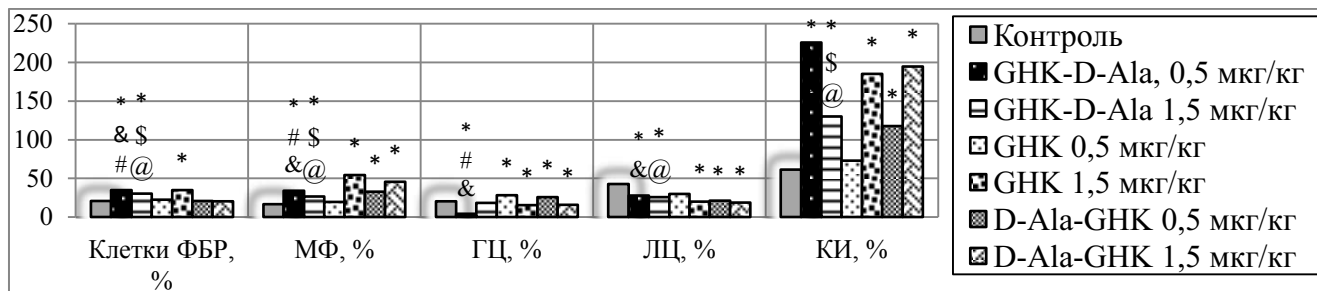


Рисунок 2. Изменение морфометрических показателей при гистологическом изучении на 10-е сутки при введении GHK, GHK-D-Ala и D-Ala-GHK ($M \pm SD / Me [1Q; 3Q]$, $n = 10$).

Примечание: * — $p < 0,05 - 0,001$ в сравнении с контрольной группой; # — $p < 0,05 - 0,001$ в сравнении с группой GHK 0,5 мкг/кг; \$ — $p < 0,05 - 0,001$ в сравнении с группой GHK 1,5 мкг/кг; & — $p < 0,05 - 0,001$ в сравнении с группой D-Ala-GHK 0,5 мкг/кг; @ — $p < 0,05 - 0,001$ в сравнении с группой D-Ala-GHK 1,5 мкг/кг

На всех сроках эксперимента после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг определялось достоверно меньшее количество гранулоцитов по сравнению и с группой контроля (в 3–5 раз, $p < 0,05 - 0,001$), и с животными, которым вводили GHK и D-Ala-GHK (в 3,5–7 раз, $p < 0,05 - 0,001$). При введении GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на 3-и сутки наблюдается увеличение числа лимфоцитов относительно обеих групп сравнения (контроль и GHK) ($p < 0,05 - 0,001$). Клеточный индекс показал, что на всех сроках наблюдения максимально выраженные регенеративные процессы происходили на фоне введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг ($p < 0,05 - 0,001$).

GHK и его аналоги оказывали существенное влияние на показатели фагоцитарной активности ПЯЛ. За счет снижения ФЧ в группах с использованием пептида GHK-D-Ala в обеих дозах на 3 и 7-е сутки, а также увеличения ($p < 0,01 - 0,001$) ФИ на 3-и сутки, значительной активации НСТ спонтанного ($p < 0,001$) на 3-и и 7-е сутки происходит ранняя активация кислородзависимого механизма бактерицидности нейтрофилов крови на фоне достоверного ($p < 0,001$) снижения завершенности фагоцитоза. Таким образом, рана быстрее очищается от микроорганизмов и девитализированных тканей, что способствует более раннему началу регенеративной фазы.

Выраженное и устойчивое стимулирующее влияние пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг послужило основанием для модификации ПХО раны с его использованием. При морфологическом изучении ран на 3-и сутки в контрольной группе и при введении GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг в обеих группах определялись

все признаки воспалительного процесса. На 7-е сутки в контрольной группе клеточный состав был представлен преимущественно лимфоцитами и нейтрофилами, а также немногочисленными клетками ФБР. С краёв раны визуализировалось нарастание тонкого слоя многослойного эпителия. Наблюдались явления активного роста и организации соединительной ткани в пределах дермы.

Начиная с 7-х суток эксперимента в группе с применением пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг происходило значимое увеличение числа клеток ФБР, сохраняющееся на 10 и 30 сутки ($p < 0,001$). Количество макрофагов снижалось ($p < 0,001$) к 30-м суткам. При этом отмечалось значимое уменьшение по сравнению с контролем количества гранулоцитов на 3-и и 30-е сутки.

На 10-е сутки у контрольных животных новообразованный эпидермис имел глубокие базальные разрастания (рис. 3, а). Отмечается отсутствие производных и преобладание толстых коллагеновых волокон в сформированном рубце (рис. 3, б). Единичная скудная лимфоцитарная инфильтрация присутствует в дерме в группе контроля. При этом в опытной группе отмечалась выраженная пролиферация и дифференцировка эпителиальной ткани (рис. 3, в). Раневой дефект был полностью заполнен рубцовой тканью. Активный ангиогенез обеспечивал улучшение трофических процессов (рис. 3, г).

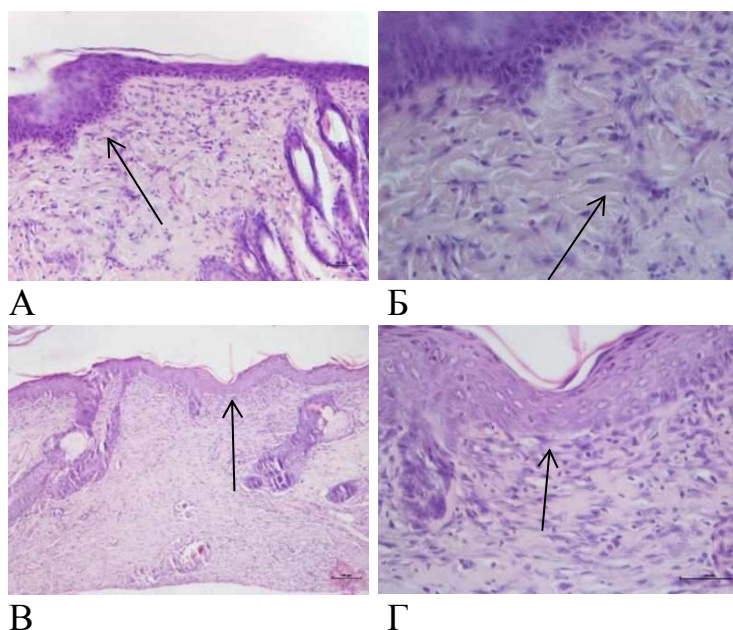


Рисунок 3. Фрагменты кожи на месте дефекта, 10-е сутки. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$ (А), $\times 400$ (Б, Г), $\times 100$ (В).

Группа контроля. А. Эпидермис имеет глубокие базальные разрастания. Б. Толстые коллагеновые волокна без производных; локальная лимфоцитарная инфильтрация.

Экспериментальная группа. В. Эпителиальная ткань с выраженной дифференцировкой и пролиферацией. Г. Зрелые клетки ФБР, активный ангиогенез.

В группе контроля на 30-е сутки фиброзная ткань, утратившая сосуды и придатки кожи, полностью заместила зону раневого дефекта (рис. 4, а). Наблюдался резко выраженный переходный слой между рубцом и intactной дермой. Эпидермис над рубцом — тонкий, с восстановленной стратификацией (рис. 4, б). В группе после введения пептида раневой дефект замещён участками сформированного эпидермиса с чёткой дифференцировкой слоёв, толщина которого не превышала уровень неповрежденной кожи (рис. 4, в).

Регенеративные процессы сопровождались формированием грануляционной ткани, замещающейся фиброзной, и на месте раневого дефекта наблюдались

разнонаправленные коллагеновые волокна (рис. 4, г). Зона перехода была сглажена. Площадь рубца была значительно меньше по сравнению с нанесенным раневым дефектом, что свидетельствует об активной контракции раны.

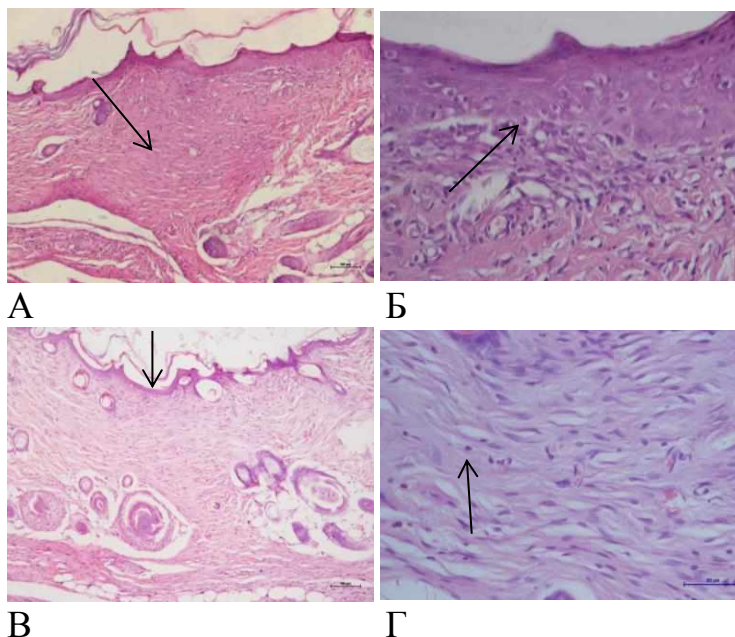


Рисунок 4. Фрагменты кожи на месте дефекта, 30-е сутки. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$ (А, В), $\times 400$ (Б, Г).

Группа контроля. А. Фиброзная ткань без придатков и сосудов. Б. Эпидермис над рубцом тонкий. Экспериментальная группа. В. Эпидермис с четкой дифференцировкой слоев, толщина на уровне интактной дермы. Г. Коллагеновые волокна разнонаправленные. Зона перехода сглажена.

Таким образом, пептид GHK-D-Ala при местном введении в дозе 0,5 мкг/кг при ПХО инфицированной кожной раны способствовал ослаблению воспалительной реакции и усилению регенеративных процессов. При этом в ране отмечалось увеличение числа клеток ФБР, макрофагов и уменьшение числа гранулоцитов на фоне активной контракции на 30-е сутки эксперимента.

Применение GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг через 24 часа при ПХО раны приводило к снижению концентрации МДА ($p < 0,001$) и АГП ($p < 0,01-0,001$) на 3, 7, 10 и 30 сутки по сравнению с контрольной группой (рисунок 5).

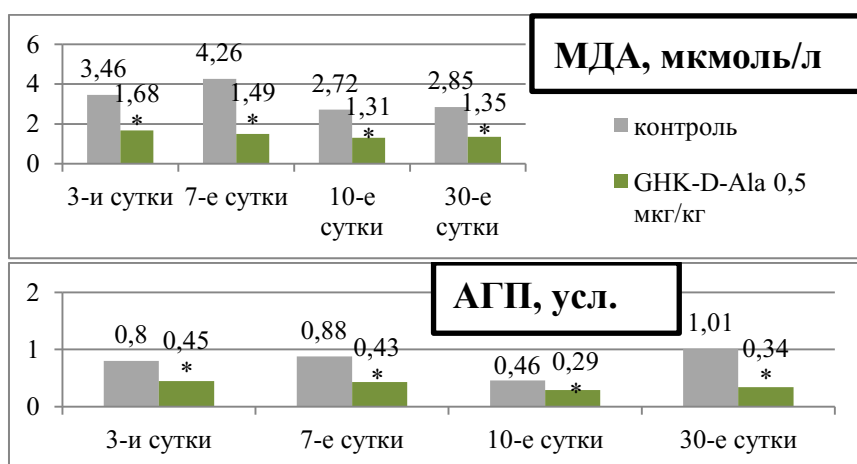


Рисунок 5. Динамика изменения биохимических показателей крови животных при введении пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг при ПХО раны (спустя 24 ч с наложением шва) на 3-и, 7-е, 10-е, 30-е сутки ($M \pm SD / Me [Q1; Q3]$, $n=10$). * – $p < 0,05-0,001$ в сравнении с контрольной группой.

Изменение активности кислородзависимых бактерицидных механизмов в спонтанном НСТ-тесте после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг через 24 часа при ПХО раны было однонаправленным и достоверно высоким на всех сроках наблюдения. Подобная направленность эффекта пептида отмечена и в

стимулированном зимозаном НСТ-тесте. При этом функциональный резерв нейтрофилов был достоверно увеличен к 10-м суткам (на 117%, $p < 0,05$), а на 30-е сутки был достоверно меньше группы контроля (на 64%, $p < 0,05$). Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов в данной группе при ПХО раны также значимо нарастала, что нашло отражение в увеличении значений ФИ на 3-и (на 12%, $p < 0,01$) и на 10-е сутки (на 7%, $p < 0,01$), ФЧ – увеличение на 3-и (на 50%, $p < 0,001$) и 10-е сутки (на 14%, $p < 0,05$), а также ИАФ на 3-и сутки (на 68%, $p < 0,001$) и на 10-е сутки (на 23%, $p < 0,01$), что свидетельствовало в пользу завершенности фагоцитарного процесса.

При этом пептид GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг, оказывая репаративный и противовоспалительный эффекты, действует на основные звенья патогенеза инфицированных ран кожи и мягких тканей (рисунок 6).



Рисунок 6. Механизмы влияния GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на процессы регенерации при кожной ране в эксперименте.

Таким образом, полученные в работе данные о влиянии пептида коллагенового происхождения GHK и его аналогов на механизмы воспаления, фагоцитоза, систему ПОЛ и антиоксидантной защиты организма, регенерации в условиях инфицированной раны кожи и далее при её ПХО раскрывают их особенности и могут быть использованы в разработке новых патогенетических путей влияния на репаративные процессы, создании препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Применение пептидов GHK, D-Ala-GHK и GHK-D-Ala на модели инфицированной кожной раны ускоряет ее заживление, оцениваемое по динамике планиметрических и клинических данных, скорости заживления, и снижает бактериальную обсемененность. При этом наиболее выраженные изменения данных показателей отмечались после введения пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг.

2. GHK-D-Ala вызывает наиболее существенное действие на процессы регенерации в условиях инфицированной кожной раны, приводя к достоверно значимому уменьшению числа гранулоцитов и лимфоцитов, при этом увеличивая пул макрофагов и клеток фибробластического ряда, а также клеточного индекса по сравнению с группой контроля и с животными, которым вводили GHK и D-Ala-GHK.

3. Пептид GHK и его аналоги D-Ala-GHK и GHK-D-Ala в условиях инфицированной кожной раны действуют на фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов, однако, степень её выраженности зависит от структуры, дозы пептида и сроков наблюдения. Эффекты структурных аналогов, в сравнении с GHK, проявляются на протяжении всего эксперимента и более выраженные.

4. Использование пептидов GHK, D-Ala-GHK и GHK-D-Ala приводит к изменению активности системы ПОЛ и антиоксидантных механизмов в условиях инфицированной кожной раны, однако их динамика, направленность и выраженность на протяжении эксперимента имеют противоречивый и разнонаправленный характер и зависят от сроков наблюдения. При этом наиболее выраженное влияние оказывает пептид GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг.

5. С-конец пептида GHK является наиболее благоприятным для присоединения D-аланина. Измененная таким образом молекула приводит к меньшей выраженности воспалительной реакции, снижению вторичной альтерации и активации регенеративных процессов при местном введении в условиях инфицированной кожной раны в сравнении с GHK и D-Ala-GHK. Именно поэтому пептид GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг применялся при первичной хирургической обработке инфицированной кожной раны в условиях наложения швов.

6. Пептид GHK-D-Ala при первичной хирургической обработке при введении в дозе 0,5 мкг/кг инфицированной кожной раны способствует ослаблению воспалительной реакции и усилению регенеративных процессов по сравнению с контрольной группой. При этом в ране отмечается увеличение числа клеток фибробластического ряда, макрофагов и уменьшение числа гранулоцитов на фоне активной контракции на 30-е сутки эксперимента.

7. Пептид GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг при первичной хирургической обработке инфицированной кожной раны ингибирует процессы перекисного окисления липидов, уменьшая вторичную альтерацию тканей, стимулирует кислородзависимые бактерицидные механизмы нейтрофилов и их фагоцитарную активность.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенное исследование свидетельствует о влиянии на фагоцитоз и окислительный стресс пептида GHK и его аналогов и необходимости дальнейших разработок и целенаправленном синтезе новых молекул синтетических аналогов регуляторных пептидов для оптимизации регенерации ран в клинических условиях.

2. Влияние пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на фагоцитоз и окислительный стресс в условиях инфицированной кожной раны открывают перспективы для изучения его эффектов для лечения кожных ран в клинических испытаниях, в том числе при первичной хирургической обработке, пластической и эстетической медицине.

3. Рекомендуется изучение в учебном процессе медицинских и биологических вузов патофизиологических основ регенерации кожи в условиях её повреждения и влияние на функцию фагоцитоза и окислительный стресс пептида GHK и его аналогов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние пептида GHK-D-Ala на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной раны / **К. К. Рахметова**, М. Е. Долгинцев, И. И. Бобынцев [и др.] // **Человек и его здоровье.** – 2021. – Т.24, №1. – С.54–61. – DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/07. [RSCI]

2. **Рахметова, К. К.** Эффекты пептида GHK-D-Ala на фагоцитарную и кислородзависимую бактерицидную активность в условиях инфицированной раны / **К. К. Рахметова**, Бобынцев И. И., Долгинцев М. Е. [и др.] // Университетская наука: взгляд в будущее : сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 87-летию Курского государственного медицинского университета. (г. Курск, 4 февраля 2022 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2022. – Т. I. – С. 54-60.

3. Regenerative effects of Gly-His-Lys and Gly-His-Lys-D-Ala peptides in infected skin wounds / **К. К. Rakhmetova**, E. S. Mishina, A. O. Vorvul [et al.] // **Bulletin of RSMU.** – 2022. – №2. – P. 58-64. – DOI: 10.24075/vrgmu.2022.014. – [Scopus, Web of Science]

4. 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 / **К. К. Рахметова**, И. И. Бобынцев, А. И. Бежин [и др.] // **Человек и его здоровье.** – 2023. – Т. 26, №1. – С. 33–44. – DOI: 10.21626/vestnik/2023-1/05. [RSCI]

5. **Рахметова, К. К.** Перекисное окисление липидов в условиях кожной раны и его коррекция пептидом GHK-D-Ala / **К. К. Рахметова**, Бобынцев И. И., Бежин А. И. [и др.] // Павловские чтения 2023 : Материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 130-летию со дня рождения профессора Н. К. Верещагина. (г. Курск, 13 октября 2023 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2023. – С. 152-153.

6. **Рахметова, К. К.** Особенности регенерации кожной инфицированной раны при применении пептида Gly-His-Lys-D-Ala / **К. К. Рахметова**, Е. С. Мишина, И.

И. Бобынцев [и др.] // Университетская наука: взгляд в будущее : сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции. (г. Курск, 8-9 февраля 2024 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2024. – С. 690-692.

7. Effects of Gly-His-Lys-D-Ala Peptide on Skin Wound Regeneration Processes / **К. К. Rakhmetova**, E. S. Mishina, I. I. Bobyntsev [et al.] // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2024. – Vol. 176, N. 3. – P. 411-416. – DOI: 10.1007/s10517-024-06035-w. [Scopus, Web of Science]

8. **Рахметова, К. К.** Регенеративные эффекты пептида GHK и его структурных аналогов D-Ala-GHK и GHK-D-Ala при кожной инфицированной ране / **К. К. Рахметова**, И. И. Бобынцев, Е. С. Мишина, А. О. Ворвуль // Клиническая патофизиология. Материалы Первого Евразийского конгресса по патофизиологии. – 2024. – Т. 30, № 2 (приложение). – С. 99.

9. Динамика заживления и изменение бактериальной обсемененности инфицированной раны при применении пептида GHK и его структурных аналогов / **К. К. Рахметова**, И. И. Бобынцев, Л. В. Жилыева [и др.] // **Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова**. – 2024. – Т. 32. – №4. – С. 539 – 548. [Scopus]

10. **Патент № 2681310** С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/07, А61Р 17/02. Способ первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей с использованием пептида Gly-His-Lys-D-Ala : № 2018131971 : заявл. **05.09.2018** : опубл. **06.03.2019** / **К. К. Рахметова**, И. И. Бобынцев, А. И. Бежин [и др.] ; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

11. **Патент № 2681216** С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/07, А61Р 17/02. Способ стимуляции регенерации инфицированных ран кожи и мягких тканей с применением пептида Gly-His-Lys-D-Ala : № 2018131972 : заявл. **05.09.2018** : опубл. **05.03.2019** / **К. К. Рахметова**, И. И. Бобынцев, А. И. Бежин [и др.] ; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОА – общая антиоксидантная активность
- АЦП – ацилгидроперекиси
- ИАФ – индекс активности фагоцитов
- КОР – коэффициент относительного ранозаживления
- МДА – малоновый диальдегид
- НСТ-тест – тест восстановления нитросинего тетразолия
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ПХО – первичная хирургическая обработка
- СЗ – скорость заживления раны
- ФБР – клетки фибробластического ряда
- ФИ – фагоцитарный индекс
- ФЧ – фагоцитарное число