

УДК 616.153.915-39-07

©Коллектив авторов

### **ВЛИЯНИЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ГРАНУЛЯЦИОННО-ФИБРОЗНОЙ ТКАНИ КРЫС.**

Т.В. ВОЛОДИНА<sup>1</sup>, Е.Г. ОЛЬШЕВСКИЙ<sup>1</sup>, Ю.В. АБРАМОВ<sup>1</sup>,  
В.В. ГУСЕВА<sup>2</sup>, Е.В. ВИНОГРАДОВА<sup>1</sup>, Г.А. ГРИБАНОВ<sup>2</sup>,  
В.Л. КОЗЕЛЬЦЕВ<sup>1</sup>, В.А. БЫКОВ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Научно-исследовательский и учебно-методический Центр биомедицинских технологий, 123056 Москва, ул. Красина, 2, факс (095)254-5681;

<sup>2</sup>Кафедра биохимии и биотехнологии Тверского государственного университета, Тверь.

Исследовали влияние длительного парентерального введения мелатонина на биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани полнослойных хирургических ран крыс в процессе заживления. Животным подкожно в течение 3-х недель вводили физиологический раствор и раствор, содержащий различные концентрации мелатонина. Образцы грануляционно-фиброзной ткани отбирали после нанесения ран, на фоне продолжающихся инъекций, на 5-й и 8-й день заживления. В отобранных образцах определяли содержание оксипролина, уроновых кислот, гексозаминов, общих липидов и их фракций, фракционный состав гликозаминогликанов и белковый состав солевых экстрактов.

Показано, что 3-х недельные инъекции растворов вызывают изменения в биохимическом составе исследуемых образцов, характерные для стрессовой реакции соединительной ткани. Указанные изменения наиболее выражены при длительном введении животным физиологического раствора. Введение в течение аналогичного срока мелатонина оказывает протекторный эффект, частично нивелируя изменения в биохимическом составе грануляционно-фиброзной ткани, вызванные стрессовой ситуацией.

**Ключевые слова:** грануляционная ткань, крысы, белки, мелатонин, липиды, гликозаминогликаны.

**ВВЕДЕНИЕ.** Эпифизарный гормон мелатонин является уникальным соединением, обладающим широким спектром биологических эффектов [1]. Хотя мелатонин нашёл применение в клинической практике в качестве средства, повышающего адаптивные возможности организма [2], сведения о механизмах

его воздействия на клетки и ткани остаются пока неполными. В частности это касается соединительной ткани, составляющей более половины массы человеческого организма. В наиболее "чистом виде" её новообразование осуществляется при заживлении ран. Поэтому грануляционно-фиброзная (ГФ) ткань, образующаяся при заживлении ран, является адекватной моделью при изучении влияния биологически активных соединений на развитие соединительной ткани.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния длительного парентерального введения мелатонина на биохимический состав ГФ ткани, образующейся при заживлении полнослойных хирургических ран у крыс.

**МЕТОДИКА.** Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200 – 250 грамм, содержащихся на стандартном рационе, в осенне-зимний период. Каждая экспериментальная группа состояла из 18-21 животного; отобранную от 3 особей ткань объединяли и дальнейшую работу проводили на 6 – 7 параллельных группах.

Материалом для исследования служила ГФ ткань полнослойной хирургической раны, полученная с помощью колец по методу Л.И.Слущкого [3]. Забор биоматериала проводили через 5 и 8 дней после операции. Животным за 3 недели до операции ежедневно в 17 – 18 часов подкожно вводили физиологический раствор (ФР) или раствор мелатонина из расчета 0,3, 1,0 и 4,0 мг на кг массы. Растворы продолжали вводить и после операции, вплоть до отбора образцов ткани.

Раствор мелатонина готовили ежедневно, непосредственно перед применением.

Для определения содержания оксипролина, гексозаминов и уроновых кислот, ткань предварительно обезжиривали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 и в количестве 1:20 по отношению к сырому весу.

Для получения нейтрально-солерастворимой фракции коллагена к 1 г сырой ткани добавляли последовательно по 10 мл 0,15М и 0,45М NaCl. Ткань гомогенизировали на гомогенизаторе "Potter S" (фирмы "Braun", Германия) при 1000 об/мин и охлаждении на льду, выдерживали в течение 1 часа при +4°C и центрифугировали (2000g, +4°C, 1 час).

Содержание гексозаминов, уроновых кислот и оксипролина определяли по ранее описанным методам [3,4].

Для анализа белков из солевых экстрактов методом двумерного электрофореза [5,6] препараты концентрировали осаждением холодным ацетоном (-18°C) в конечной концентрации 80% и растворяли в лизирующем буферном растворе: 9,5 М мочевины, 5% 2-меркаптоэтанол, 2% амфолины pH 3,5-10, 10% тритон X-100 до конечной концентрации 2-3 мг/мл. Количество белка в экстрактах определяли по методу Бредфорд [7]. Полученные образцы хранили при -60°C.

Для разделения белков в первом направлении использовали неуравновешенный электрофорез в формирующемся градиенте pH [6]. В работе использовали амфолины pH 3,5-10 фирмы "Pharmacia" (Швеция).

Фракционирование во втором направлении проводили в системе Лэммли [8] в пластинах полиакриламидного геля (160×160×1 мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 9-25%, при постоянном токе 20 мА на пластину геля. По окончании разделения белки окрашивали по методу Неухова [9]. В качестве



маркеров для определения величины молекулярной массы использовали экстракт белков мышцы сердца крысы [10].

Получение общего липидного экстракта (ОЛЭ) проводили обработкой образца ГФ ткани двадцатикратным количеством смеси хлороформа с метанолом (2:1) с последующим промыванием ОЛЭ по прописи Фолча с соавт. [11]. После двукратного промывания, объем проб доводили метанолом до 3-4 мл. Полученные очищенные экстракты использовали для определения общих липидов (ОЛ) и последующего хроматографического разделения их на фракции.

В основу количественных микрометодов определения ОЛ и их фракций после микротонкослойной хроматографии положена модификация методики кислотно-термического разложения липидов с последующей фотометрией продуктов разложения [12].

Для анализа гликозаминогликанов (ГАГ) методом ионообменной хроматографии гомогенат грануляционно-фиброзной ткани в 0,5 М ацетатном буфере (рН 7,5) выдерживали на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Затем инкубировали в течение 24 часов при 65°C с проназой В из расчёта 0,01 мг фермента/мг сухого веса ткани, после охлаждения до 4°C белки осаждали равным объёмом 10% ТХУ, отделяли центрифугированием, а надосадочную фракцию после диализа против 0,1 М NaCl использовали для дальнейшего фракционирования.

ГАГ разделяли на колонке с Dowex 1x2, 400 меш, размером 0,9x30 см, объёмом 19 мл. Элюцию проводили с использованием ступенчатого градиента концентрации NaCl – 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 М. Фракции собирали по 5 мл и определяли в них содержание уроновых кислот [4].

Для проведения морфологических исследований образцы ткани размерами 0,5 × 0,5 мм фиксировали в течение 2 часов в 2,5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на какодилатном буфере рН 7,2. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации образцы заключали в эпоксидную смолу Эпон-812.

Из блоков получали полутонкие срезы, которые окрашивали трёхкомпонентным красителем, содержащим основной фуксин, метиленовый синий и азур II.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В табл. 1 представлены результаты определения содержания оксипролина, уроновых кислот и гексозаминов в образцах ГФ ткани, полученных от животных после предварительного ежедневного (в течение 3 недель) подкожного введения различных доз мелатонина.

При анализе данных обращают на себя внимание результаты определения оксипролина в образцах ткани животных, получавших до и в течение 5 дней развития раневого процесса инъекции ФР. Содержание оксипролина в образцах ткани этих животных при сопоставлении с данными для контрольной группы ниже и составляют  $12,8 \pm 1,3$  и  $16,5 \pm 1,6$  мг/г соответственно ( $p < 0,05$ ).

В образцах ГФ ткани, отобранных на 8 сутки развития, отмеченное различие ещё больше увеличивалось и составляло  $19,5 \pm 1,1$  и  $24,4 \pm 1,2$  мг/г соответственно ( $p < 0,05$ ).

Введение животным растворов мелатонина сопровождалось снижением содержания в образцах исследуемой ткани оксипролина до значений, близких к таковым, полученным в экспериментах с введением ФР. Представленные в

таблице 1 результаты не позволяют выявить зависимость уровня снижения содержания оксипролина в образцах ГФ ткани от концентрации мелатонина в растворах. Содержание оксипролина в 0,15 М NaCl экстрактах в экспериментальных образцах, заметно ниже аналогичных значений, определённых для контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1. Биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани при парентеральном применении мелатонина (мг/г сухой обезжиренной ткани).

№ п/п	Группа животных	Длительность эксперимента (сутки)	Оксипролин			Уроновые кислоты	Гексозамины
			Общий	0,15 М NaCl экстр.	0,45 М NaCl экстр.		
1	Контроль	5	16,5±1,6	0,13±0,01	0,14±0,02	5,8±0,3	27,1±2,0
2	Инъекции ФР		12,8±1,3	0,08±0,01*	0,13±0,02	6,1±0,5	19,3±1,4*
3	Инъекции мелатонина 0,3 мг/кг		12,1±0,8	0,07±0,01*	0,11±0,02	6,5±0,8	20,9±1,6*
4	Инъекции мелатонина 1 мг/кг		13,2±1,4	0,06±0,01*	0,13±0,01	6,1±0,4	22,7±0,9*
5	Инъекции мелатонина 4 мг/кг		12,1±1,1	0,08±0,02*	0,10±0,01	5,4±0,4	21,1±1,0*
6	Контроль	8	24,4±1,2	0,15±0,05	0,20±0,04	6,0±0,1	28,1±2,3
7	Инъекции ФР		19,5±1,3	0,06±0,01	0,09±0,01*	6,0±0,5	19,5±1,2
8	Инъекции мелатонина 0,3 мг/кг		19,3±1,2	0,06±0,01	0,09±0,02*	6,0±0,3	20,3±1,1
9	Инъекции мелатонина 1 мг/кг		16,8±1,1	0,06±0,01	0,11±0,02*	6,4±0,4	18,8±0,9
10	Инъекции мелатонина 4 мг/кг		16,4±1,0	0,07±0,01	0,10±0,01*	6,5±0,4	20,1±1,0

Примечание. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

В 0,45 М NaCl экстрактах содержание оксипролина в образцах на 5 день развития ГФ ткани не имело достоверных различий для всех экспериментальных групп.

Однако, на 8 день развития содержание оксипролина в 0,45 М NaCl экстракте из образцов контрольной группы было выше по сравнению с животными, получавшими инъекции как ФР, так и раствора мелатонина. Следует отметить, что увеличение фракции нейтрально-солерастворимого коллагена характерно для интенсивно растущих тканей.

Избирательная экстракция коллагенов при действии различных растворителей является своеобразным отражением процесса фибриллогенеза коллагеновых белков в соединительной ткани: свободные или непрочно связанные между собой молекулы коллагена экстрагируются нейтральными солевыми растворами и представляют одну из первых стадий в процессе образования коллагенового волокна.



Снижение величины содержания оксипролина в солерастворимых фракциях на фоне сокращения прироста его количества в тканевых образцах свидетельствует в пользу торможения развития биосинтетических процессов в ГФ ткани, развивающейся у животных на фоне 26-29 дневных инъекций.

Однако, скорость заживления вырезанных хирургических ран у животных различных экспериментальных групп практически не отличалась.

Следует также отметить практически одинаковый уровень содержания гексозаминов в ткани инъецированных животных на 5 и на 8 день развития, тогда как в контрольной группе уровень гексозаминов на 5 день развития достоверно выше и составляет  $27,1 \pm 2$  мг/г ( $p < 0,05$ ). Этот эффект может быть связан с противовоспалительными свойствами мелатонина [2].

Все солерастворимые фракции были проанализированы методом двумерного ЭФ по О'Фарреллу. На рис. 1 представлены фрагменты двумерных электрофореграмм в диапазоне  $M_r$  30-50 кДа 0,45 М NaCl экстрактов из 8-дневной грануляционно-фиброзной ткани контрольных образцов и образцов, полученных на фоне ежедневных инъекций ФР и раствора мелатонина из расчёта 4 мг/кг.

При парентеральном применении мелатонина, начиная с дозы 1 мг/кг, наблюдается уменьшение фракции 2 (рис. 1В), тогда как местное его применение сопровождается резким дозозависимым уменьшением обеих фракций – 1 и 2 [13]. Кроме того, длительные инъекции как ФР, так и мелатонина приводят к уменьшению и даже практическому отсутствию полипептидных фракций 5, 6, 7, 8 и появлению ряда фракций в зонах 3, 4 кислого конца градиента рН (рис. 1 Б, В).

Нам не удалось обнаружить различий в области распределения  $\alpha$ -цепей коллагена, характерного для препаратов, полученных из ткани, развивавшейся на фоне местного применения мелатонина [13].

Таким образом, трехнедельные подкожные инъекции ФР и раствора мелатонина приводят к изменениям содержания оксипролина в ГФ ткани крыс, а также к изменению электрофоретического распределения экстрагируемых белков.

В таблицах 2 и 3 представлены величины абсолютного содержания различных фракций общих липидов в образцах ГФ, полученных на фоне предварительного 3-недельного введения животным различных доз мелатонина, ФР и соответствующие показатели у интактных крыс.

Как видно из представленных в табл. 2. данных, ежедневные инъекции ФР приводят в 5-дневных образцах более чем к двукратному увеличению содержания ОЛ по сравнению с интактной группой животных. Применение мелатонина в дозах 0,3 и 1 мг/кг частично нивелирует данный эффект и сопровождается уменьшением содержания ОЛ ( $p < 0,05$ ), тогда как при дозе 4 мг/кг достоверного снижения ОЛ не происходит. При анализе фракционного состава ОЛ выявлено, что увеличение их содержания происходит в основном за счет триглицеридов (ТГ) и свободных жирных кислот (СЖК).

Под влиянием мелатонина у животных, получавших его в дозах 0,3 и 1 мг/кг, отмечается резкое снижение уровня ТГ по сравнению с группой, получавшей инъекции ФР. Параллельно происходит увеличение относительного количества диглицеридов (ДГ) и СЖК, а при дозе 4 мг/кг – фосфолипидов (ФЛ).

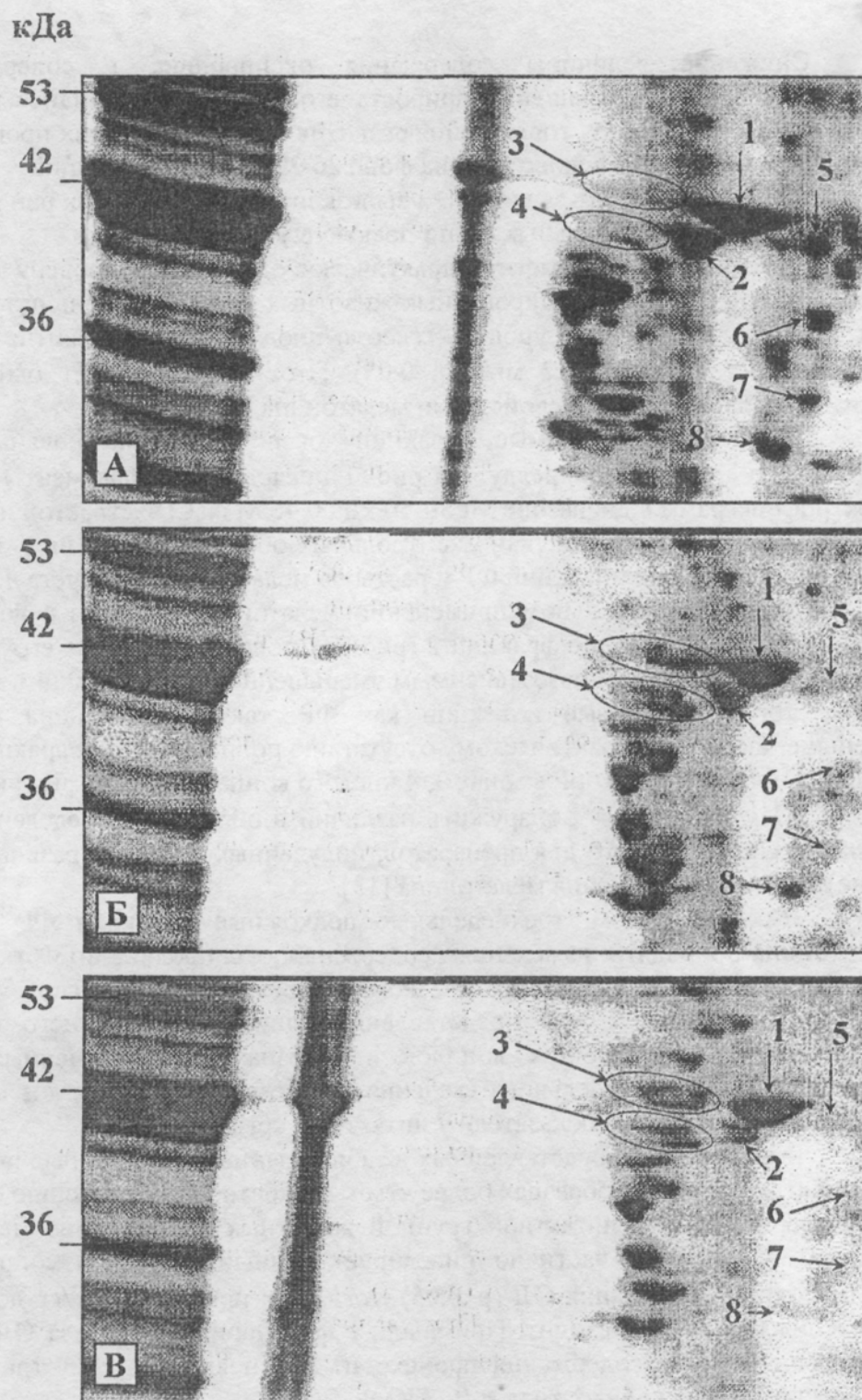


Рисунок 1.  
 Фрагменты двумерных электрофоретических гелей белков 0,45M NaCl экстрактов из 8-дневной  
 грануляционно-фиброзной ткани. А – контроль, Б –предварительные трёхдневные  
 инъекции физ.раствора, В – инъекции мелатонина в дозе 4 мг/кг.



**Таблица 2.** Изменение содержания общих липидов в грануляционно-фиброзной ткани белых крыс при длительном применении разных доз мелатонина через 5 дней после начала эксперимента (в мг/100 г влажной массы).

Группа	ОЛ	ФЛ	ДГ	Х	СЖК	ТГ	ЭХ
1. Контроль	2347,4±140,8	286,3±21,1	105,6±25,8	138,5±9,4	162,0±18,8	1532,9±122,1	122,1±11,7
2. Инъекции ФР	6110,9±1367,3*	238,3±122,2	189,4±12,2*	183,3±48,9	476,7±36,7*	4821,5±244,4*	201,7±48,9
3. Мелатонин 0,3 мг/кг ежедневно	2260,1±518,6	178,5±67,8	201,1±6,8*	137,9±6,8	449,8±97,2*	1057,7±65,5	235,1±33,9*
4. Мелатонин 1,0 мг/кг ежедневно	3015,6±148,8	238,2±27,1	138,7±1,5	99,5±21,1	298,5±18,1*	2071,8±4,8*	168,9±21,1
5. Мелатонин 4,0 мг/кг ежедневно	4579,6±733,3*	329,7±32,1*	123,6±2,3	109,9±22,9	412,2±110,0*	3448,5±73,3*	155,7±41,2

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1 (интактные животные).

**Таблица 3.** Изменение абсолютного содержания общих липидов в грануляционно-фиброзной ткани белых крыс при длительном применении разных доз мелатонина через 8 дней после начала эксперимента (в мг/100г влажной массы).

Группа	ОЛ	ФЛ	ДГ	Х	СЖК	ТГ	ЭХ
1. Контроль	1333±93	202,6±13,3	181,2±2,7	76,0±9,3	105,2±20,0	692,0±48,0	76,0±9,3
2. Инъекции (ФР)	1812±332	230,1±21,7	110,5±1,8*	159,4±36,2*	177,6±3,6*	1012,8±67,0*	121,4±10,9*
3. Мелатонин, 0,3 мг/кг ежедневно	1022±132	215,7±21,5	98,2±4,1*	66,5±20,5	173,8±33,7*	359,8±18,4*	108,4±7,2
4. Мелатонин 1,0 мг/кг ежедневно	1445±90	270,2±26,0	99,7±5,8*	105,5±4,3	182,1±23,1*	667,7±10,1	119,9±13,0*
5. Мелатонин 4,0 мг/кг ежедневно	1593±39	235,8±60,5	135,4±27,1	113,1±19,1*	200,7±31,9*	740,9±109,9	167,3±27,1*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1 (интактные животные).

На 8 сутки развития ГФ ткани уровень содержания ОЛ значительно снижен по сравнению с 5-дневными образцами. Достоверных различий в содержании ОЛ в образцах, полученных от различных экспериментальных групп, не отмечается (табл.3). Однако, на фоне ежедневных инъекций ФР так же, как и в 5-дневных образцах, отмечается увеличение ТГ, максимальное снижение уровня которых наблюдается при дозе мелатонина 0,3 мг/кг.

При морфологическом исследовании на 5-е сутки развития раневого процесса (рис. 2) в зоне грануляции преобладает жировая ткань, разделенная на дольки соединительной тканью. Липиды заполняют жировые клетки и расположены между волокнами и клеточными элементами. Анализ микрофотографий позволяет отметить различную интенсивность связывания липидов с использованным красителем. Наблюдаемые различия во взаимодействии липидов с красителем могут указывать на различия в химическом составе липидных капель.

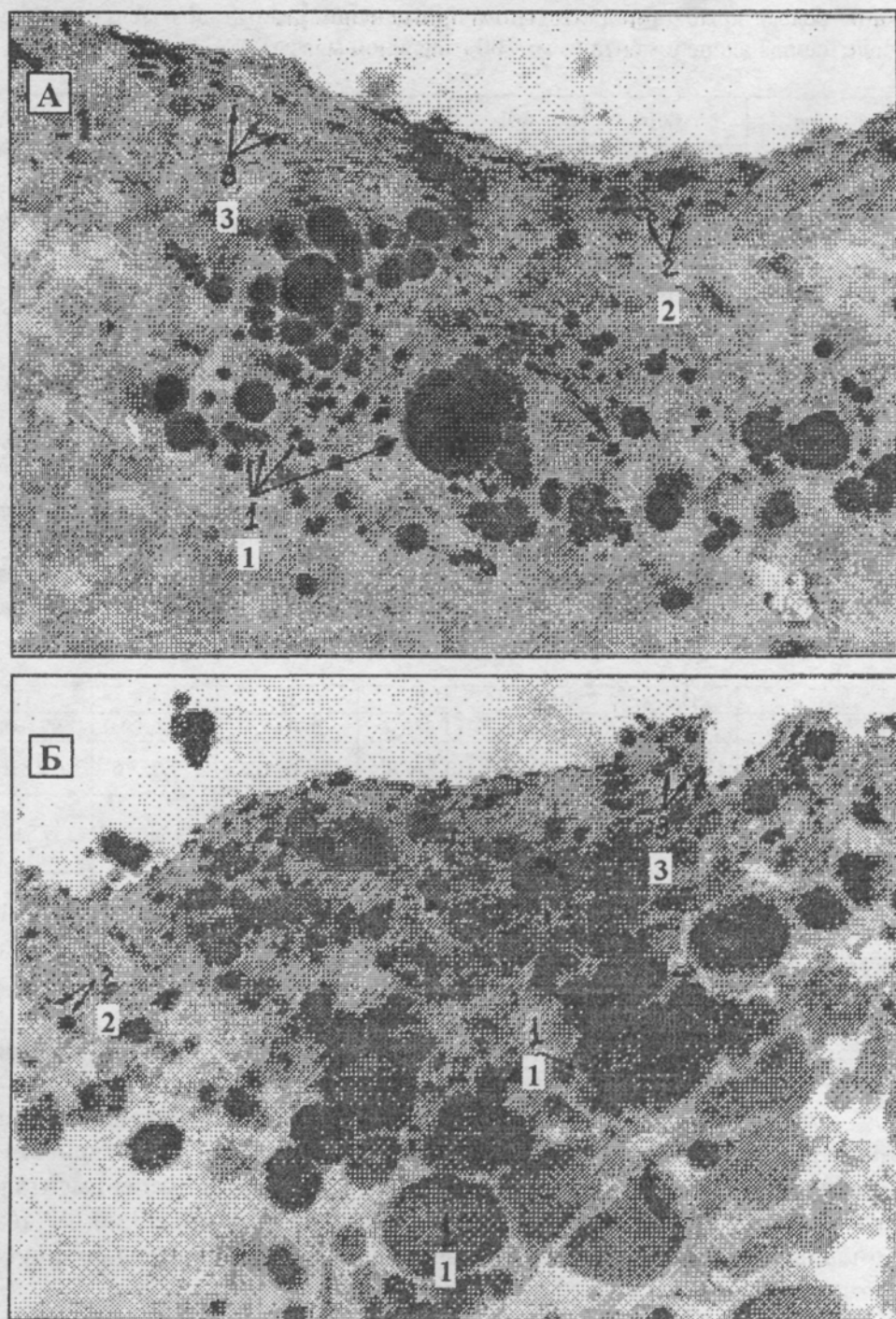


Рисунок 2.

Микрофотографии грануляционно-фиброзной ткани на 5 день развития на фоне парентерального применения мелатонина. Полутонкий срез. Окраска 3-х компонентным красителем. Ув.  $\times 25 \times 8$ . А – контроль. Б – мелатонин (в дозе 4 мг/кг): 1 - жировые капли; 2 – клетки; 3 – волокна.



Ежедневные 3-недельные инъекции мелатонина оказывали также влияние и на фракционный состав ГАГ развивающейся грануляционно-фиброзной ткани. На рис. 3 представлены профили элюции соединений, содержащих уроновые кислоты, при ионообменной хроматографии. Из представленных данных видно, что в контрольных образцах грануляционно-фиброзной ткани преобладающим является материал 15-20 фракций (рис. 3А), тогда как на фоне инъекций физиологического раствора отмечалось резкое увеличение фракции 29, соответствующей хондроитин-сульфатам (рис. 3Б).

Подобный характер фракционного изменения ГАГ, характеризующийся увеличением фракции хондроитин-сульфатов, наблюдался нами ранее при местном применении мелатонина [13]. Применение мелатонина приводило к снижению величины фракции хондроитин-сульфатов (рис. 3В), а соотношение пиков 10 и 29 фракций приближалось к контрольным образцам (рис. 3А).

Анализ результатов исследования образцов ГФ ткани животных, которым длительное время подкожно вводили ФР и растворы мелатонина, позволяет сделать заключение, что процедура ежедневного проведения инъекций явилась стрессорным фактором. На возможность возникновения морфофункциональных изменений организации соединительной ткани под влиянием стресса указывают данные, опубликованные в литературе [14]. Сообщается, что развитие стрессовых состояний может влиять на содержание в соединительной ткани основных биополимеров – коллагена, гексозаминов, гликозаминогликанов, липидов. Так по данным Housk и соавт. [15], в коже стрессированных крыс отчетливо возрастает катаболизм коллагена и снижается уровень его содержания. Есть сведения о существенном изменении характеристик ГАГ кожи при эмоциональном стрессе [16]. В работе Грибанова и соавт. [17] сообщается, что в коже под влиянием водно-иммерсионного стресса значительно повышается содержание ОЛ.

Приведённые выше данные литературы о влиянии стресса на биохимию соединительной ткани хорошо согласуются с результатами наших экспериментов. Так, ежедневные инъекции животным ФР и растворов мелатонина вызвали уменьшение содержания оксипролина в тканевых образцах, и в солерастворимых фракциях. Электрофоретический анализ 0,45 М NaCl экстрактов ГФ ткани животных, которым длительно вводили ФР и растворы мелатонина, выявил сходные по отношению к контролю изменения белкового состава в диапазоне Mr 30-50 кДа. Введение ФР крысам сопровождалось также более чем двукратным увеличением содержания ОЛ в образцах ГФ ткани (5-е сутки развития раневого процесса) относительно контрольных образцов. Ежедневные 3-х дневные инъекции ФР и растворов мелатонина влияли на фракционный состав ГАГ. Так при ионообменной хроматографии на профилях элюции соединений, содержащих уроновые кислоты, уменьшалось содержание материала 15-20 фракций. Вместе с тем результаты хроматографии гликозаминогликанов экстрактов образцов ГФ ткани крыс, которым вводили ФР, показывают значительное увеличение содержания в них фракции хондроитинсульфатов.

Таким образом, сопоставление собственных результатов с данными литературы даёт основание для заключения, что изучение влияния мелатонина на ГФ ткань при парентеральном введении гормона мы проводили на фоне стресса, развившегося у крыс под влиянием процедуры инъекций.

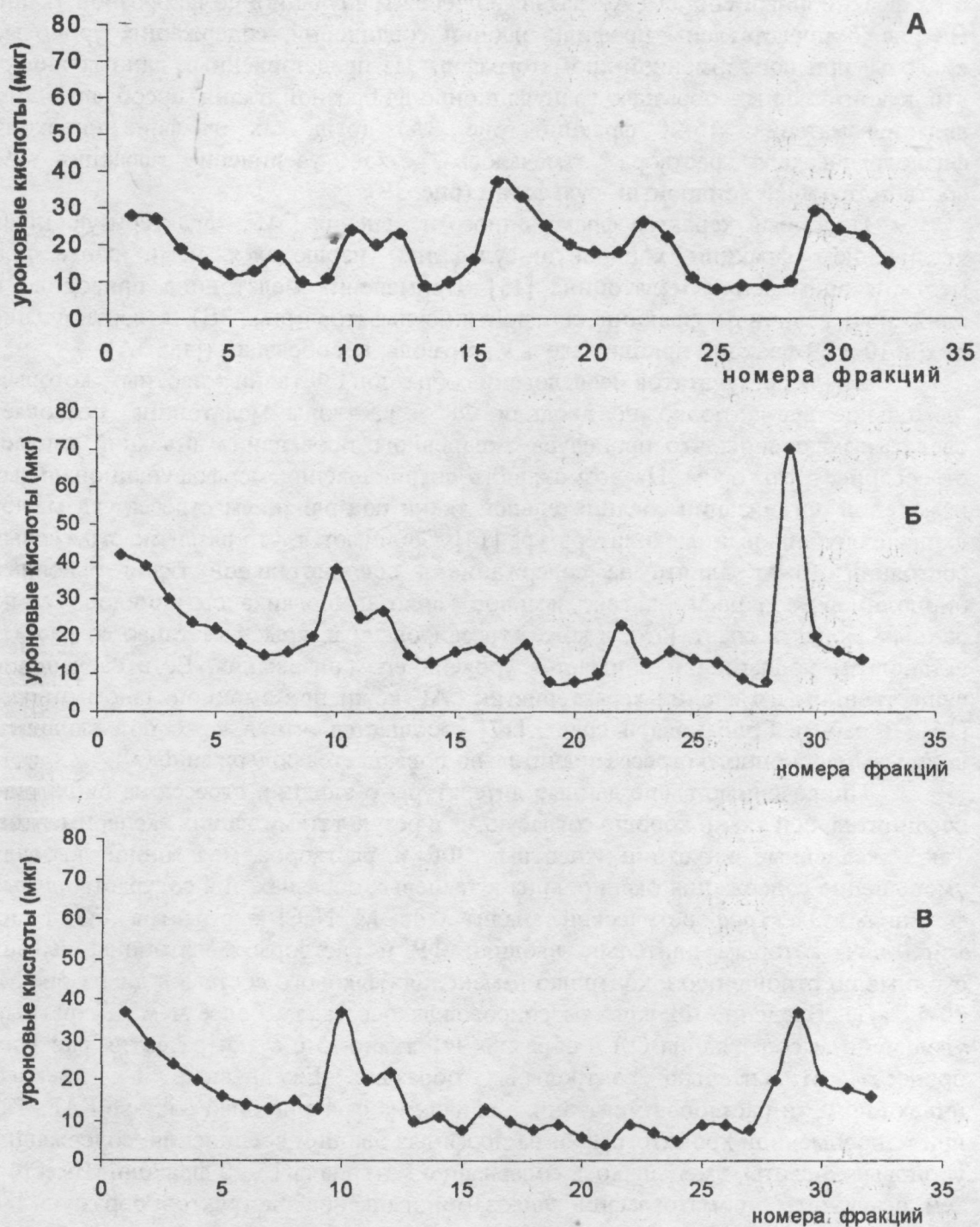


Рисунок 3.

Профили элюции ГАГ при ионообменной хроматографии (Dowex 1×2).

А - экстракт из нормальной грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития; Б - экстракт из грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития на фоне 29-дневного п/к введения физ.раствора; В - экстракт из грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития на фоне 29-дневного п/к введения мелатонина (4 мг/кг).



Известно, что мелатонин является одним из компонентов стресспротекторных систем организма [18]. В этой связи следует ожидать, что перентеральное введение животным гормона, обладающего стресспротекторными свойствами, окажет влияние на результаты биохимического исследования ГФ ткани. Действительно, содержание ОЛ в образцах ткани животных, которым вводили растворы мелатонина, было близким к норме. Сопоставление профилей элюции при ионообменной хроматографии гликозаминов экстрактов из образцов тканей полученных от животных, которым вводили ФР и растворы мелатонина, позволяет отметить их существенное отличие. Профиль элюции, соответствующий хроматограмме ГАГ из экстрактов тканей животных получавших инъекции мелатонина характеризуется заметным снижением пика соответствующего фракции хондроитинсульфатов. Эти результаты позволяют высказать предположение, что введение мелатонина в условиях стрессовой для животных ситуации оказывало нормализующее воздействие на фракционный состав ГАГ при заживлении ран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lerner A.B.* (1999) *Pigm. Cell. Res.*, **12**, 131-144.
2. *Wetterberg L.* (1999) *Reprod. Nutr. Develop.*, **39**, 367-382.
3. *Слуцкий Л.И.* (1969) Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани. Л. Медицина.
4. *Chandrasekaran E.V., BeMiller J.N.* (1980) *Meth. in Carbohydr.*, **8**, 89-96.
5. *O'Farrell H.H.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
6. *O'Farrell P.Z., Goodman H.M., O'Farrell P.H.* (1977) *Cell*, **12**, 1133-1142.
7. *Bradford M.M.* (1976) *Analyt. Biochem.*, **72**, 248-254.
8. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680.
9. *Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhard W.* (1988) *Electrophoresis.*, **9**, 255-262.
10. *Giometty C.S., Anderson N.G., Tollaksen S.L. et al.* (1980) *Anal. Biochem.*, **102**, 47-58.
11. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A.* (1957) *J. Biol. Chem.*, **266**, 497-509.
12. *Грибанов Г.Ф., Сергеев С.А. Алексеенко А.С.* (1976) *Лаб. дело*, **12**, 724-727.
13. *Ким Рен Хва, Ольшевский Е.Г., Маркина Л.Г. и др.* (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 52-61.
14. *Бабичев Н.В.* (1996) Морфофункциональные перестройки кожного покрова у пушных зверей под влиянием препарата "мелакрил". Автореф. дисс. канд. биол. наук. М.
15. *Houck J.C., Jacob R.A., Sharma V.K. et al* (1968) *Adv. Biol. Skin. Vol. X. The Dermis*, 49-67.
16. *Абрамов Ю.В., Володина Т.В., Маркина Л.Г. и др.* (1999) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **127**, 134-146.
17. *Грибанов Г.А., Костюк Н.В., Абрамов Ю.В. и др.* (1999) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **127**, 463-465.

18. *Maestroni G.J.M, Conti A. (1989) Int. Immunopharmacol., 2, 333-340.*

Поступила 26.07.00

**THE INFLUENCE OF MELATONIN'S PARENTERAL INFUSION TO  
BIOCHEMICAL COMPOSITION OF RAT'S GRANULATE TISSUE.**

**T.V. VOLODINA<sup>1</sup>, E.G. OLSHEVSKY<sup>1</sup>, Yu.V. ABRAMOV<sup>1</sup>, V.V. GUSEVA<sup>2</sup>, E.V.  
VINOGRADOVA<sup>1</sup>, G.A. GRIBANOV<sup>2</sup>, V.L. KOZELTSEV<sup>1</sup>, V.A. BYKOV<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Research Centre of Biomedical Technology, 123056 Moscow, Krasin str., 2,  
fax (095)254-56-81.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Tverskoy State University, Tver.

The influence of long term parenteral melatonin administration on the biochemical composition of granulation tissue of surgical wounds in rats during healing was investigated. Physiological solution and solutions containing various concentrations of melatonin were subcutaneously enjected to the animals within 3 weeks. Control and injected animals were wounded. Samples of granulation tissue were investigated on the 5-th and the 8-th day of healing. The contents of oxyprolin, uronic acids, hexosamines, total lipids and their fractions, fractional composition of glycosaminoglicans and proteins composition of salt extracts were determined in the se samples.

Repeated injections during three weeks caused the changes in biochemical composition of researched samples which were characteristic for stressful reaction of connective tissue. The specific changes are most expressed at long term introduction of a physiological solution to animals. The introduction of melatonin during similar period cased protective effect, partially defending biochemical composition of granulation tissue from changes, which were induced by stressful situation.

**Key words:** granulation tissue, rats, proteins, melatonin, lipids, glycosaminoglicans.