

УДК 616.153.915-39-07

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРАНУЛЯЦИОННО- ФИБРОЗНОЙ ТКАНИ КРЫС.

КИМ РЁН ХВА, Е.Г.ОЛЬШЕВСКИЙ, Л.Г.МАРКИНА, Ю.В.АБРАМОВ,
Т.В.ВОЛОДИНА, В.Л.КОЗЕЛЬЦЕВ, В.А.БЫКОВ.

Научно-исследовательский и учебно-методический центр биомедицинских
технологий, 123056, Москва, ул. Красина, 2, факс (095)254-5681

Изучено влияние местного применения мелатонина на скорость заживления хирургических ран и биохимический состав образующейся грануляционно-фиброзной ткани у крыс. Показано замедление заживления ран, поверхность которых обрабатывалась растворами мелатонина. Выявлены различия в электрофоретическом спектре белков, экстрагируемых нейтральными солевыми растворами, увеличение фракции нейтрально-солерастворимого коллагена, усиление экспрессии минорных форм коллагеновых молекул, присутствующих в нормальной коже. Показано изменение спектра экстрагируемых из грануляционно-фиброзной ткани гликозаминогликанов, и более раннее нарастание под влиянием мелатонина хондроитин-сульфатов.

Ключевые слова: грануляционно-фиброзная ткань, кожа, мелатонин, белки, гликозаминогликаны.

ВВЕДЕНИЕ. Индольный амин мелатонин (N-ацетил-5-метокси-триптамин), открытый в 1958 г. А.Лернером, находит в последние годы всё большее практическое применение как снотворное, антидепрессант, иммуностимулятор, регулятор суточных ритмов при длительных перелётах и работе в ночную смену, компонент косметических препаратов [1-4]. Имеются сведения о попытках его применения для лечения язвенной болезни [5], тогда как в лабораторных условиях он может приводить к усилению язвообразования у крыс [6].

Развитие грануляционно-фиброзной ткани - проявление репаративной функции соединительной ткани - представляет собой универсальную реакцию организма на повреждение. Репаративные процессы в коже сопровождаются многочисленными и разнообразными изменениями раневого поля,

существенными биохимическими перестройками белкового, углеводного, липидного и минерального обменов в нем.

К настоящему времени выполнены многочисленные исследования, посвященные проблемам регуляции раневого процесса с помощью различных физико-химических факторов, лекарственных, гормональных и других препаратов. Однако, влияние различных гормонов на развитие грануляционно-фиброзной ткани изучено недостаточно. В особенности это касается мелатонина - гормона, синтезирующегося в организме человека из серотонина в основном (на 80%) эпифизом, а также сетчаткой глаза, цилиарным телом, органами желудочно-кишечного тракта и обладающего выраженной антиоксидантной активностью.

Сведения о влиянии мелатонина на соединительную ткань, пролиферацию фибробластов, эпителиальных клеток остаются немногочисленными и противоречивыми.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния различных концентраций мелатонина на пролиферативную реакцию соединительной ткани и особенностей биохимического состава образующейся грануляционно-фиброзной ткани.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар весом 200-250 г, содержащихся на стандартном рационе, в осенне-зимний период. Материалом для исследования служила грануляционно-фиброзная ткань, полученная с помощью колец по методу Слуцкого [7]. Забор биоматериала проводился через 5 и 8 дней после операции.

В экспериментах по изучению скорости заживления ран препараты наносились на раневую поверхность в течение 8 дней, затем кольцо удалялось, нанесение препаратов прекращалось и определялась скорость заживления раны.

Мелатонин ("Sigma", США) растворяли непосредственно перед опытом в минимальном объеме 96% этанола, а затем доводили до нужной концентрации водой. На раневую поверхность в кольцо помещали целлофановую пленку, на которую наносили по 0,1 мл испытуемых растворов мелатонина с концентрацией 1,5 и 15 мг/мл в течение 5 и 8 дней соответственно. В контрольной серии использовали воду с аналогичными количествами спирта.

Измерение площади раневой поверхности при заживлении проводили планиметрически.

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

Для получения нейтрально-солеорастворимой фракции коллагена к 1г сырой ткани добавляли последовательно по 10 мл 0,15M, и 0,45M NaCl. Ткань гомогенизировали на гомогенизаторе «Potter S» (фирмы Braun) при 1000 об/мин и охлаждении во льду, выдерживали в течение часа при +4°C, затем центрифугировали при 20000g, +2°C, в течение 1 часа.

Содержание оксипролина, гексозаминов и уроновых кислот определяли по методам, описанным ранее. [7, 8].

Для анализа белков из солевых экстрактов методом двумерного электрофореза [9, 10] препараты концентрировали осаждением холодным ацетоном (18°C) 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 Брэдфорда [11]. Полученные образцы хранили при -60°C .

Для разделения белков в первом направлении использовали неуравновешенный электрофорез в формирующемся градиенте pH (NEPHGE) [10]. Пробы наносили с анодного конца в количестве 200-250 мкг белка на один гель. Католитом служил 0,02 М NaOH, анолитом - 0,01 М H_3PO_4 . Фракционирование проводилось в следующем электрическом режиме: 200 В - 1 час и 500 В - 5 часов. В работе использовали амфолины pH 3,5-10 фирмы "Pharmacia" (Швеция).

По окончании разделения в первом направлении гели извлекали из стеклянных трубочек и производили процедуру уравнивания при комнатной температуре в течение 30 мин. в буферном растворе состава: 0,125 М трис-HCl pH 6,8, 2% DS-Na, 5% 2-меркаптоэтанол и 10% глицерин.

Фракционирование во втором направлении проводили в системе Лэммли [12] в пластинах полиакриламидного геля ($160 \times 160 \times 1$ мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 9-25%. Электрофорез проводился при постоянном токе 20 мА на пластину геля. По окончании разделения белки окрашивали по методу Neuhoff [13]. В качестве маркёров для определения величины молекулярной массы использовали экстракт белков мышцы сердца крысы [14].

Для анализа гликозаминогликанов методом ионообменной хроматографии гомогенат грануляционно-фиброзной ткани в 0,5 М ацетатном буфере (pH 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 0,1М NaCl использовали для дальнейшего фракционирования.

Гликозаминогликаны 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 2,0М. Фракции собирали по 5 мл и определяли в них содержание уроновых кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице 1 представлены результаты, характеризующие динамику заживления открытых хирургических дефектов кожи при аппликации на раневую поверхность раствора мелатонина различной концентрации. Как видно из представленных данных, мелатонин тормозит заживление ран. Так в контрольной серии экспериментов заживление ран у животных наступало в среднем на 20° сутки, тогда как применение растворов с концентрациями 1,5 мг и 15 мг/мл увеличивало этот срок до 45 и 60 дней соответственно.

Наряду с удлинением сроков заживления ран мелатонин при местном его применении оказывает влияние и на биохимический состав грануляционной ткани.

В следующей серии экспериментов нами было изучено влияние местного применения мелатонина на биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани.

Таблица 1. Динамика заживления ран у крыс при аппликации раствора мелатонина на раневую поверхность.

Группа Животных	Площадь раны в мм ² на сутки								
	0	10	13	15	20	25	30	45	60
Контроль	314±2	154±15	67±7	26±3	Зажив- ление				
Мелатонин 0,4 мг/мл	314±2	157±13	108±11	30±3	13±2	Зажив- ление			
Мелатонин 1,5 мг/мл	314±2	170±17	138±14	124±12	60±5	45±5	23±3	Зажив- ление	
Мелатонин 15 мг/мл	314±2	180±18	148±13	140±15	80±10	60±8	36±6	25±4	Зажив- ление

В табл.2 обобщены результаты определения содержания оксипролина, уроновых кислот и гексозаминов в грануляционной ткани при ежедневном смачивании раневой поверхности растворами мелатонина в различных концентрациях. Из приведенных в табл.2 данных видно, что с увеличением срока развития с 5 до 8 дней, как в контрольных, так и в опытных образцах ткани отмечается уменьшение содержания гексозаминов (на фоне относительно стабильного содержания уроновых кислот) и увеличение количества оксипролина.

Таблица 2. Биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани при местном применении мелатонина.

№	Группа	Длитель- ность эксперим- ента (сутки)	мг/г сухой обезжиренной ткани				
			Оксипролин			Уроно- вые кислоты	Гексоз- амины
			Общий	В 0,15M NaCl экстр.	В 0,45M NaCl экстр.		
1.	Контроль, ежедневное смачивание 0,1мл H ₂ O	5	16,5±1,6	0,13±0,01	0,14±0,02	5,8±0,3	27,1±2,0
2.	Ежедневное смачивание 0,1мл р-ра мелатонина 1,5 мг/мл		12,2±1,0	0,14±0,01	0,24±0,02	5,6±0,7	26,3±2,4
3.	Ежедневное смачивание 0,1мл р-ра мелатонина 15,0 мг/мл		11,3±1,3	0,14±0,01	0,23±0,01	5,6±0,04	26,1±2,6
4.	Контроль, ежедневное смачивание 0,1мл H ₂ O	8	24,4±1,2	0,15±0,05	0,20±0,04	6,0±0,1	21,8±2,3
5.	Ежедневное смачивание 0,1мл р-ра мелатонина 1,5 мг/мл		24,5±3,0	0,21±0,01	0,35±0,10	6,5±0,5	23,0±0,4
6.	Ежедневное смачивание 0,1мл р-ра мелатонина 15,0 мг/мл		24,3±1,8	0,22±0,01	0,66±0,12	6,1±0,4	21,1±1,2

Полученные результаты находятся в соответствии с основными закономерностями развития грануляционно-фиброзной ткани. Как известно, в

ранние сроки после травмирующего воздействия в очаге повреждения доминируют изменения, отражающие некробиотические процессы и появление воспалительного экссудата, что сопровождается накоплением гликопротеидов сыворотки крови и увеличением содержания в воспалительной ткани гексозаминов. Следующая фаза процесса – пролиферация грануляционно-фиброзной ткани характеризуется накоплением фибробластов, обладающих высокой функциональной активностью, что обуславливает последующий синтез и фибриллогенез коллагена.

Характерный «перекрёст» концентраций коллагена и гексозаминов, отмечаемый при острых фиброзных реакциях, по-видимому, связан с рассасыванием воспалительного экссудата и постепенным уменьшением содержания в ткани растворимых глико- и мукопротеинов и параллельным усилением биосинтеза коллагена.

Биохимический анализ выявил под влиянием мелатонина некоторое снижение содержания суммарного количества оксипролина в грануляционно-фиброзной ткани на 5-е сутки развития, которое выравнивалось к восьмым. Содержание оксипролина в нейтрально-солеорастворимой фракции увеличивалось уже на 5-е сутки, а к 8-м превышало контрольное значение в 2 раза. Следует отметить, что подобное различие отмечалось при экстракции 0,45 М NaCl, тогда как в 0,15 М экстрактах различий не отмечалось. Содержание уоновых кислот и гексозаминов было близким к контрольным значениям.

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

При анализе белкового состава солеорастворимых фракций по методу О'Фаррелла нами был также обнаружен ряд различий. На рис. 1 представлены фрагменты двумерных электрофореграмм 0,45 М NaCl экстрактов грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития контрольной серии и полученной при смачивании раневой поверхности растворами мелатонина.

В зоне с $M_r > 200$ кДа, ближе к кислому концу геля, появляется двойная фракция, указанная стрелкой 1 и полностью отсутствующая в контроле. Величина и форма пятна зависели также от количества нанесённого на раневую поверхность мелатонина.

В диапазоне с M_r 100-200 кДа выявляется 5 гетерогенных фракций (пятна 2-6), идентифицируемых нами как различные α -цепи коллагена. Все эти фракции представлены также в солевых экстрактах из кожи (рис.2А). Коллаген кожи на 80-85% представлен молекулами коллагена I типа - $[\alpha_1(I)]_2 \alpha_2(I)$, 15-20% составляют молекулы коллагена III типа - $[\alpha_1(III)]_3$, и как минорный компонент присутствуют молекулы коллагена типа V - $[\alpha_1(V)]_2 \alpha_2(V)$.

В солевом экстракте из хвостового сухожилия, коллаген которого представлен I типом молекул, выявляется 2 основных вида цепей - $\alpha_1(I)$ и $\alpha_2(I)$ (рис.2Б), положение которых при двумерном электрофорезе в ПАГ совпадает с фракциями 3 и 5 грануляционно-фиброзной ткани и кожи.

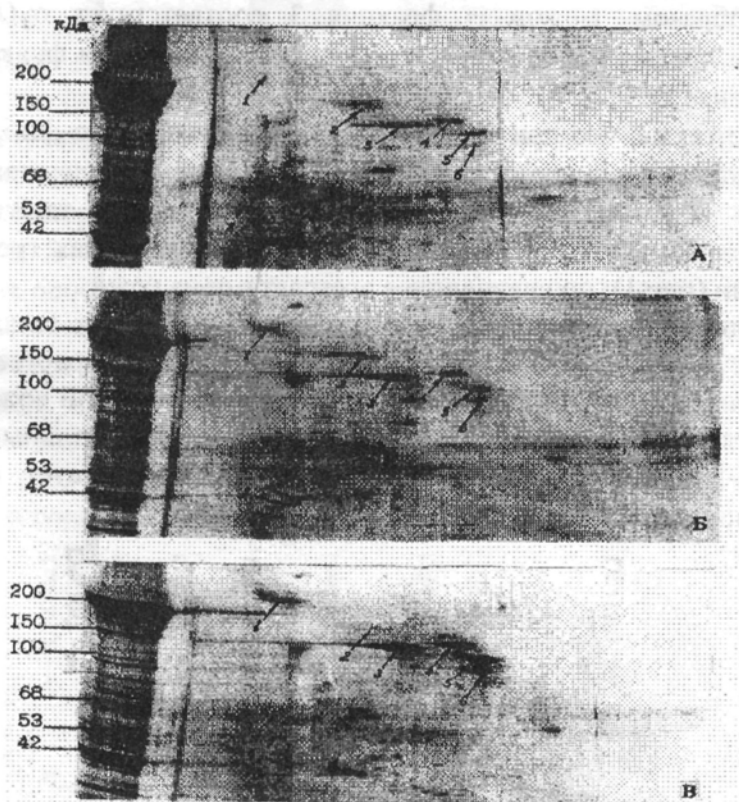


Рисунок 1

Фрагменты двумерных электрофореграмм белков 0,45M NaCl экстрактов из грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития на фоне местного применения мелатонина. А – контроль, Б – мелатонин – 0,15 мг, В – мелатонин – 1,5 мг.

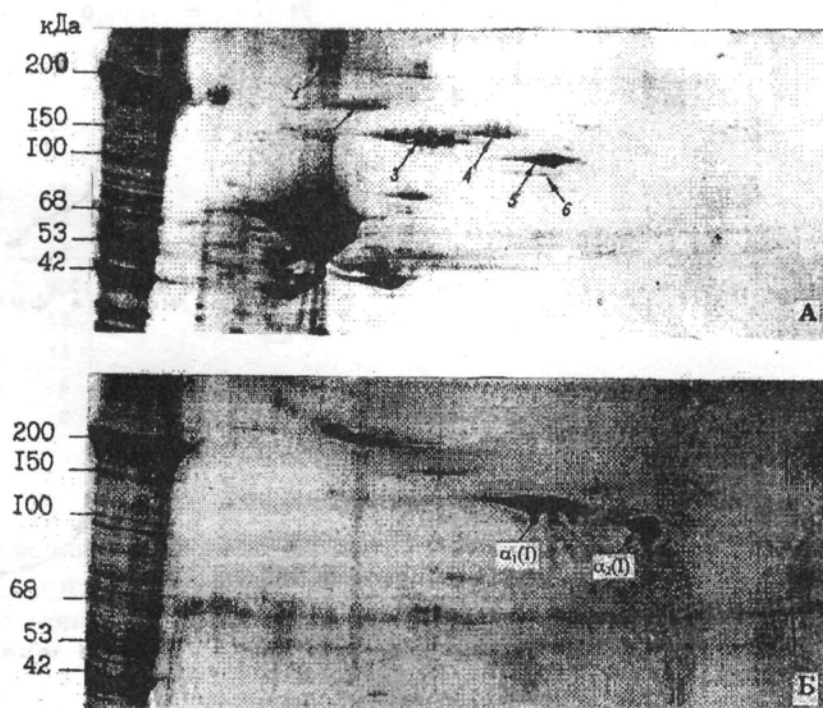


Рисунок 2

Фрагменты двумерных электрофореграмм белков 0,45M NaCl экстрактов из кожи (А) и хвостового сухожилия крысы (Б).

Таким образом, мажорная фракция 3 соответствует $\alpha_1(I)$, имеющей наименьшую M_r среди изоформ цепи α_1 , фракция 4 - $\alpha_1(III)$, и фракция 5 - $\alpha_2(I)$, имеющей M_r менее цепи $\alpha_1(I)$.

Известно также, что при воспалении и в грануляционно-фиброзной ткани увеличивается количество коллагена III типа, повышенное содержание которого характерно для кожи эмбрионов и новорожденных. Нами также отмечается увеличение фракции 4 относительно фракций 3 и 5 в образцах грануляционно-фиброзной ткани (рис. 1), по сравнению с экстрактами из кожи.

В грануляционной ткани из ран, поверхность которых была обработана мелатонином, с увеличением применяемой концентрации нарастает фракция 6 (рис. 1 Б, В), являющаяся минорным компонентом в нормальной коже (рис. 2А) и определяющаяся в следовых количествах в контрольных образцах грануляционно-фиброзной ткани (рис. 1А), что свидетельствует об усилении экспрессии минорных изоформ α -цепей коллагена.

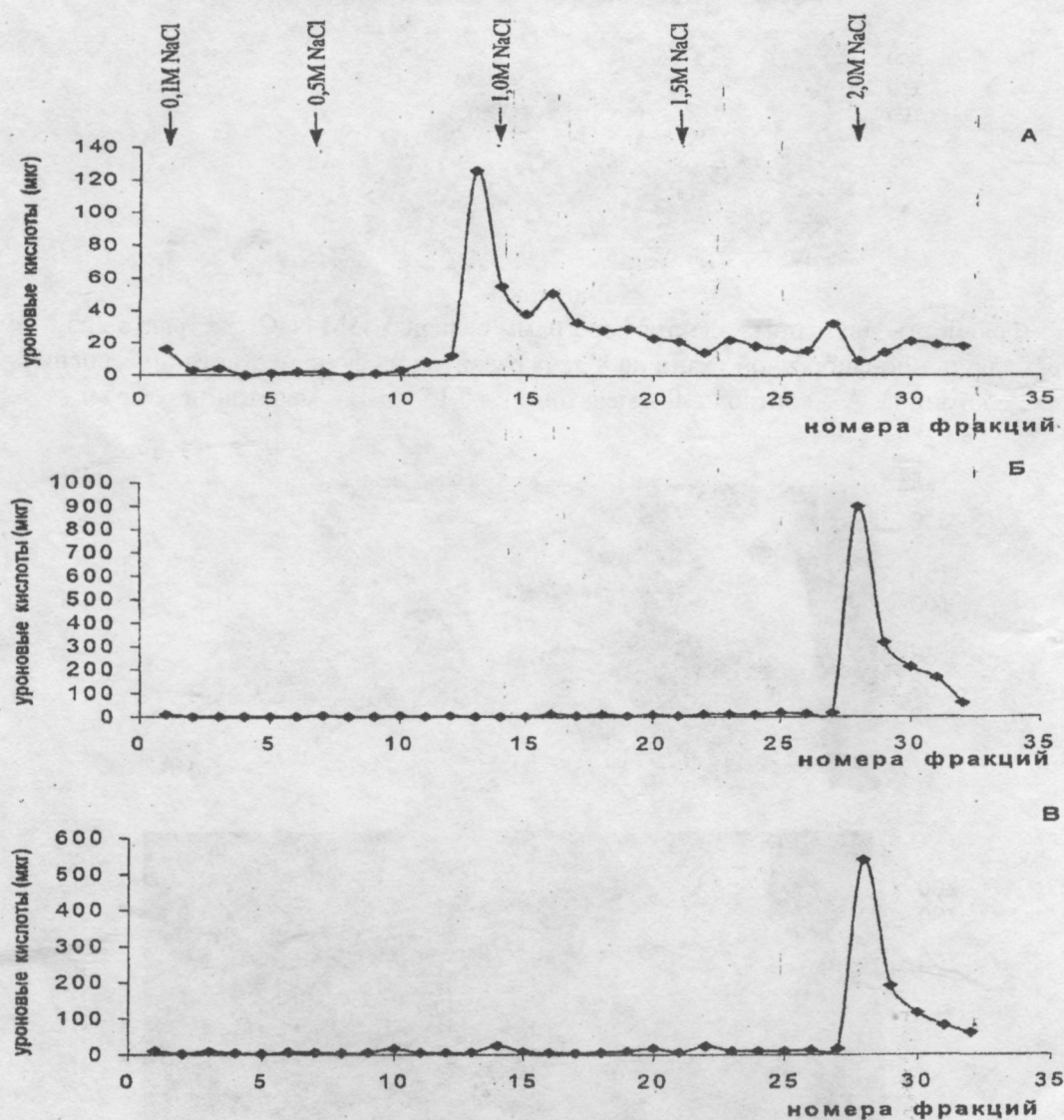


Рисунок 3

Профили элюции коммерческих препаратов гликозаминогликанов при ионообменной хроматографии (Dowex 1x2). А – гиалуроновая кислота. Б – хондроитин-сульфат А. В – хондроитин-сульфат В.

Для ряда других фракций имеется обратная зависимость. Так в контроле имеются фракции с Мг 45 и 42 кДа, уменьшающиеся при дозе мелатонина 0,15 мг и практически полностью отсутствующие при дозе 1,5 мг.

Фракционный состав гликозаминогликанов был проанализирован методом ионообменной хроматографии. На рис.3 представлены профили элюции с колонки коммерческих препаратов гиалуроновой кислоты и хондроитин-сульфатов А и В (дерматан-сульфата). Гиалуроновая кислота элюируется с колонки двумя основными фракциями и рядом дополнительных, причем степень этой гетерогенности зависит от фирмы-изготовителя, длительности и режима хранения препарата. Хондроитин-сульфаты элюируются одним гомогенным пиком, профили их элюции совпадают. Следует отметить, что хромогенный выход в карбазоловой реакции для хондроитин-сульфата В (дерматан-сульфата) почти в два раза меньше, чем для хондроитин-сульфата А, что связано с наличием в его составе идуоновой кислоты.

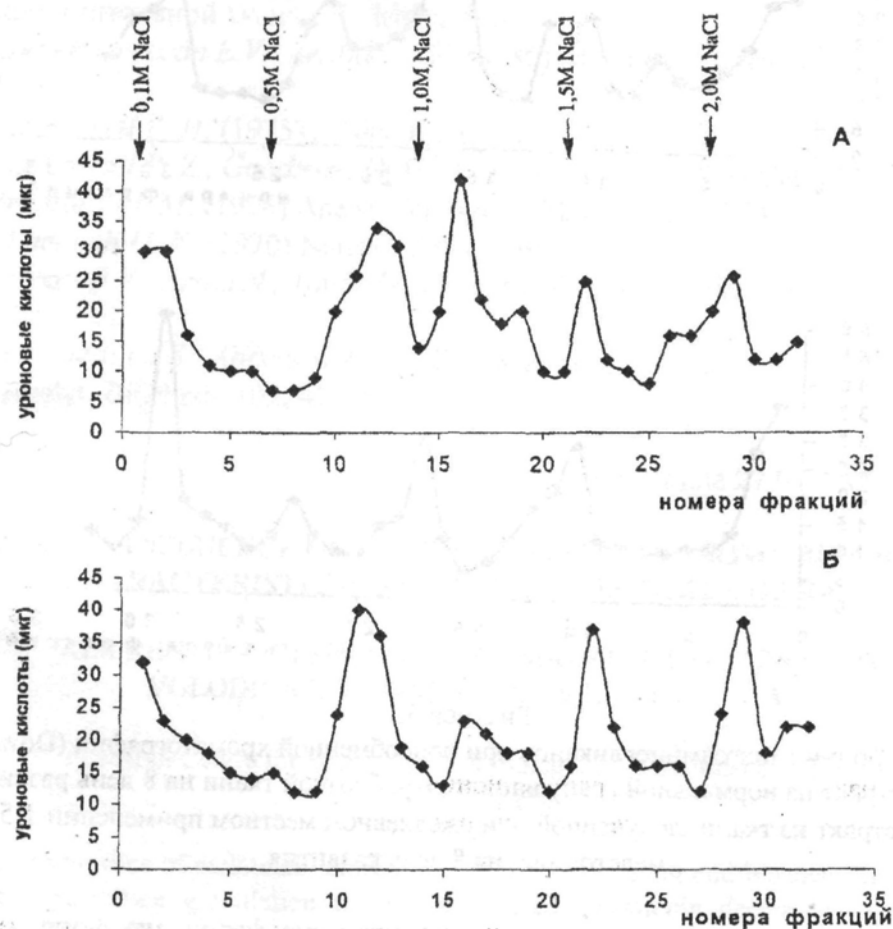


Рисунок 4

Профили элюции гликозаминогликанов при ионообменной хроматографии (Dowex 1x2). А – экстракт из нормальной грануляционно-фиброзной ткани на 5 день развития. Б – экстракт из ткани, полученной при ежедневном местном применении 1,5 мг мелатонина, на 5 день развития.

На рис.4А и рис.5А представлены профили элюции соединений, содержащих уроновые кислоты из фиброзно-грануляционной ткани через 5 и 8 дней развития соответственно, а на рис.4 Б и 5 Б – из аналогичных образцов,

развивавшихся на фоне местного применения мелатонина. Обращает внимание превалирование в контрольных образцах материала в 15-25 фракциях, тогда как на фоне применения мелатонина на 5 сутки превалирующим является пик, соответствующий гиалуроновой кислоте, а на 8 – хондроитин-сульфатам.

На первых этапах развития грануляционно-фиброзной ткани накопление гликозаминогликанов происходит главным образом за счёт гиалуроновой кислоты, которая позднее замещается хондроитин-сульфатами. Возможно, что

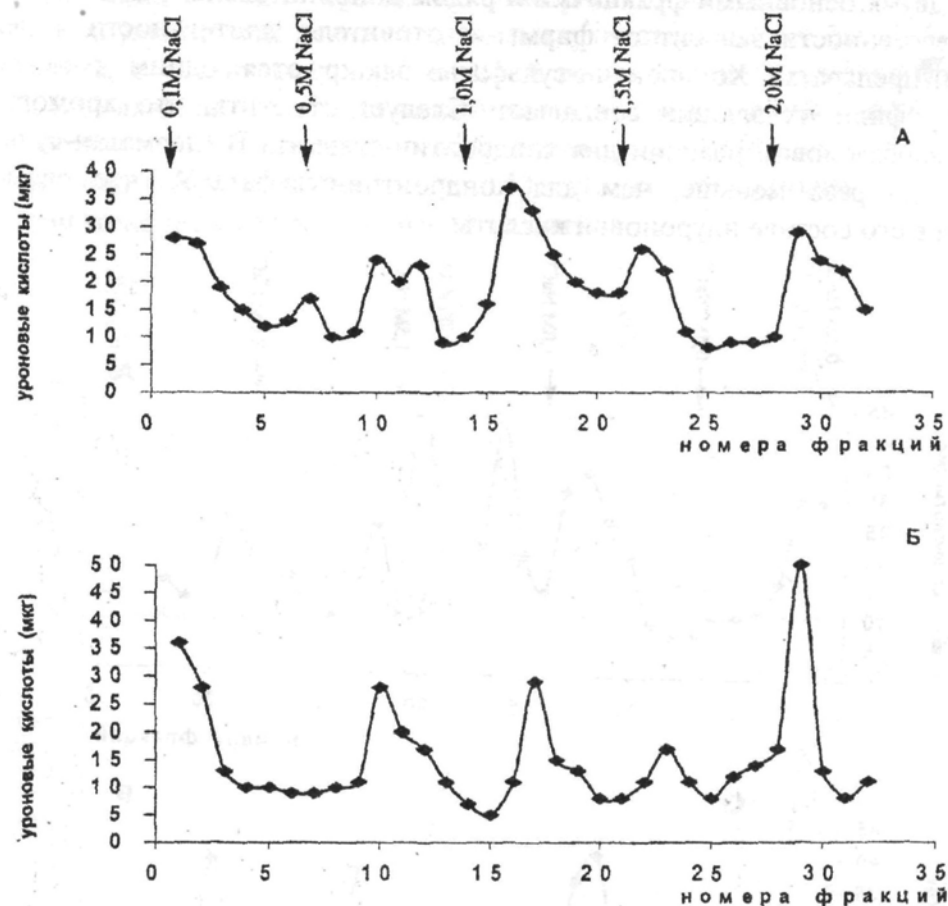


Рисунок 5.

Профили элюции гликозаминогликанов при ионообменной хроматографии (Dowex 1x2).

А – экстракт из нормальной грануляционно-фиброзной ткани на 8 день развития.

Б – экстракт из ткани, полученной при ежедневном местном применении 1,5 мг мелатонина, на 8 день развития.

более раннее накопление в ткани хондроитин-сульфатов на фоне местного применения мелатонина препятствует механизмам нормального фибриллогенеза.

Таким образом, под влиянием местного применения мелатонина в грануляционно-фиброзной ткани изменяется спектр растворимых белков, увеличивается доля нейтрально-солерастворимого коллагена, изменяется фракционный состав гликозаминогликанов, что, вероятно, является одной из причин значительного замедления репаративных процессов при заживлении ран.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arendt J.* (1994) *Advances in Pineal Research.* (Lond.), **8**, 439-441.
2. *Banerjee S., Margulis L.* (1973) *Exp. Cell Res.*, **78**, 314-318.
3. *Reiter R.J.* (1980) *Endocr. Rev.*, **1**, 109-131.
4. *Reiter R.J., Poeggeler B., Tan D.X. et al.* (1993) *Neuroendocrinol. Lett.*, **15**, 1-2, 103-116.
5. *Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К. и др.* (1998) *Клин. Мед.*, **3**, 15-18.
6. *Перцов С.С., Сосновский А.С., Пирогова Г.В.* (1998) *Бюл. эксп. биол. мед.* **125**, (1), 12-14.
7. *Слуцкий Л.И.* (1969). *Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани.* Л.: Медицина.
8. *Chandrasekaran E.V., BeMiller J.N.* (1980) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **8**, 90.
9. *O'Farrell P. H.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
10. *O'Farrell P. Z., Goodman. H. M., O'Farrell P. H.* (1977) *Cell*, **12**, 1133-1142.
11. *Bradford M. M.* (1976) *Analyt. Biochem.*, **72** (1-2), 248-254.
12. *Laemmli U. K.* (1970) *Nature*, **227** (5259), 680.
13. *Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.* (1988). *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
14. *Giometti C. S., Anderson N. G., Tollaksen S. L., Edwards J. J., Anderson N. L.* (1980) *Analyt. Biochem.* **102**, 47-58.

Поступила 27.01.2000.

MELATONIN INFLUENCE ON WOUND-HEALING AND SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF GRANULATION TISSUE OF RATS.

KIM REN HVA, OLSHEVSKII E.G., MARKINA L.G., ABRAMOV YU.V.,
VOLODINA T.V., KOZELTZEV V.L., BYKOV V.A.

Research Centre for Biomedical Technology, 123056 Moscow, Krasin str., 2,
fax (095) 254-56-81

The influence of melatonin application on wounds healing and biochemical composition of rat regenerating granulation tissue was studied. Melatonin decreased healing rate of wounds. The differences in electrophoretic pattern of proteins extracted by neutral saline solutions were detected. Melatonin increased quantity of neutral soluble collagen fraction and gene expression of minor types of collagen in normal skin. Spectrum of glycosaminoglycans' was changed, and earlier increase of chondroitinsulfats induced by administration of melatonin was observed.

Key words: granulation tissue, skin, melatonin, protein, glycosaminoglycans.