

## ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА НА ЛИПИДЫ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ РАН

И. И. Воробьев

*ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России*

**Цель исследования:** исследовать влияние мелатонина на липидный спектр при регенерации кожных ран крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты проводились на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г в осенне-зимний период. Животных содержали на стандартной диете при естественной освещенности. Эксперименты проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (FELASA).

Для получения грануляционно-фиброзной ткани использовали традиционный метод Слуцкого Л.И. [1]. Для этого у животных, находящихся под эфирным наркозом, в межлопаточной области делали циркулярный разрез кожи диаметром 1,5 см, в который для предотвращения эпителизации и контракции вставляли кольцо из органического стекла с внешним диаметром 2,9 см и внутренним – 2,0 см, имеющим выступ, за счет которого кольцо прочно фиксировалось на коже без наложения швов. Поверхность раны покрывалась подсыхающей корочкой – струпом, под которым развивалась грануляционно-фиброзная ткань. Через 5 или 8 дней после операции кольцо снимали и срезали пласт грануляционно-фиброзной ткани, которую использовали для получения липидных экстрактов и их дальнейшего качественного и количественного анализа.

Сроки эксперимента (5, 8 дни) были выбраны исходя из литературных данных [2], согласно которым, на 5 день регенерации начинается формирование грануляционно-фиброзной ткани, к 8-10 дню регенерации грануляционно-фиброзная ткань считается зрелой. Влияние мелатонина на липиды грануляционно-фиброзной ткани крыс исследовали в условиях вечернего (17.00-18.00 часов) воздействия экзогенного гормона. Выбор времени обусловлен тем, что при естественном цикле выработки мелатонина наибольшее количество его рецепторов свободно именно в вечерние часы. Растворы мелатонина готовили непосредственно перед применением. Для этого, мелатонин (производитель «Healthway Production Inc.», США) растворяли сначала в 96 % этаноле из расчета 1 мг препарата в 15 мкл спирта и после полного растворения доводили до объема 5 мл физиологическим раствором при использовании в дозе 0,3 мг на кг веса крысы или доводили до объема 0,5 мл физиологическим раствором при использовании в дозе 4 мг на кг веса животного. Влияние мелатонина на липиды раневого поля кожи крыс изучали на модельной системе, когда предварительно длительно подкожно вводили гормон в дозах 0,3 и 4 мг на кг веса по схеме: 21 день до эксперимента и ежедневно в течение 5 и 8 дней после нанесения раны. Контрольным животным вводили 1 мл физиологического раствора [2].

В современных фармацевтических справочниках приводятся данные о лечебных дозах (3-6 мг сутки на человека) препарата мелатонина по использованию его для восстановления ритмов сна, приспособления к быстрой смене часовых поясов, сменному режиму работы. Однако, до сих пор не указаны точные дозы мелатонина

для использования его в процессе заживления кожных ран. Поэтому дозы гормона были выбраны как на основании литературных данных о влиянии мелатонина на липидный и углеводный обмена в организме животных, так и исходя из физиологической концентрации мелатонина в крови крыс – 0,1 мг/кг [2].

Экстракцию липидов из грануляционно-фиброзной ткани крыс проводили методом Фолча [3]. Полученный липидный экстракт использовали для дальнейшего качественного и количественного анализа липидов. Определение содержания общих липидов (ОЛ) и их фракции проводили методом нагревания высушенных липидных экстрактов с концентрированной  $H_2SO_4$  в течение 15 - 20 минут при температуре 190 - 200<sup>0</sup> С. После охлаждения образцы разбавляли водой 1:1 и измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм (для общих липидов) или 400 нм (для отдельных фракций). Содержание общих липидов и их отдельных фракций в образцах определяли с помощью калибровочных графиков. Фракционирование липидов проводили с помощью метода микротонкослойной хроматографии на силикагеле, гель Л 5/40 «Хемапол». Разделение общих липидов на фракции проводили в системе растворителей гексан - диэтиловый эфир - метанол - уксусная кислота в соотношении 9:2:0,2:0,3 по объему. Таким образом, были получены следующие классы липидов: фосфолипиды (ФЛ), диглицериды (ДГ), холестерол (Х), свободные жирные кислоты (СЖК), триглицериды (ТГ), эфиры холестерола (ЭХ). Элюирование липидных фракций проводили смесью хлороформа и этанола (3:2 по объему) для ДГ, Х, СЖК, ТГ, ЭХ. Полученные экстракты высушивали и использовали для количественного определения отдельных фракций липидов. Полученные значения подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

#### **Результаты и их обсуждение**

На ранних сроках регенерации грануляционно-фиброзная ткань крыс богата липидами. Преобладающей фракцией в молодой грануляционно-фиброзной ткани являются ТГ, на долю которых приходится более 70 % суммы ОЛ, а также СЖК и ФЛ. Высокое содержание липидов отмечено также в работе Ким Рен Хва (2000) [4]. При гистологическом исследовании липиды обнаруживаются в виде крупных и мелких капелек жира, разбросанных по всей толще в грануляционно-фиброзной ткани. Биологический смысл накопления липидов, вероятно, состоит в создании депо материала, который может служить источником энергии для роста и деления клеток, синтеза элементов внеклеточного матрикса. К более поздним срокам регенерации (8 день) выявлено двукратное снижение уровня ОЛ, в основном за счет ТГ и СЖК. Данный факт, вероятно, связан с завершением формирования грануляционно-фиброзной ткани и ее созреванием. В период с 5 по 8 день регенерации основными процессами, протекающими в исследуемой ткани, по-видимому, являются: ограничение притока из крови различных веществ, в том числе и липидов, гидролитическое расщепление части липидов на энергетические и пластические процессы, в том числе, на синтез белка [4].

Проведенное экспериментальное исследование показало, что введение МТ в низкой дозе (0,3 мг/кг) и высокой дозе (4 мг/кг) оказывает влияние на разные группы липидов грануляционно-фиброзной ткани крыс в процессе регенерации. Особое внимание обращает на себя динамика ФЛ на разных сроках регенерации при длительном введении МТ в указанных дозах. Использование МТ в дозе 0,3 мг/кг на ранних и более поздних сроках регенерации вызывает снижение уровня ФЛ по сравнению с соответствующим сроком у контрольных животных. При этом, в

динамике регенерации (от 5 дня регенерации к 8 дню) отмечено недостоверное повышение количества ФЛ, свидетельствующее, что низкая доза гормона не оказывает влияния на процессы регенерации кожных ран крыс.

Инъекции МТ в высоких дозах – 4 мг/кг на 5 день регенерации способствовали тенденции к увеличению доли ФЛ, что свидетельствует об усилении пролиферации клеток грануляционно-фиброзной ткани крыс, характерное для ранних сроков регенерации. Однако, на 8 день регенерации происходит снижение содержания ФЛ практически до уровня в контрольной группе животных.

Вероятными механизмами влияния мелатонина на биохимические процессы являются особенности молекулярных механизмов действия этого гормона. Показано, что распределение и активность рецепторов зависит от типа ткани, времени суток, сезона. В настоящее время известно 3 типа мембранных рецепторов мелатонина (MT1, MT2, MT3), относящихся к разным семействам [5]. Передача сигналов внутрь клетки осуществляется аденилатциклазным, гуанилатциклазным путем и через изменение активности фосфолипазы С. Обнаружены также ядерные ретиноидные рецепторы мелатонина (ROR/RZR), которые выступают в качестве факторов активации транскрипции. Помимо прямых механизмов в функционировании мелатонина могут быть задействованы его биологически активные метаболиты, в частности 5-метокситриптамин. Кроме этого известно, что мелатонин является одним из компонентов стресспротекторных систем организма [5]. В этой связи следует ожидать, что парентеральное введение животным гормона, обладающего стресспротекторными свойствами, несомненно, оказывает влияние на результаты биохимического исследования грануляционно-фиброзной ткани.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что длительное применение МТ только в высокой дозе – 4 мг/кг оказывает стимулирующий эффект на процессы регенерации кожных ран на ранних сроках раневого процесса.

### **Выводы**

1. Длительное подкожное введение экспериментальным животным мелатонина в дозе 0,3 мг/кг не оказывает влияния на процессы регенерации кожных ран.
2. Использование мелатонина в дозе 4 мг/кг стимулирует регенерацию ран кожи крыс на ранних сроках раневого процесса.
3. Представляется перспективным продолжение комплексного изучения влияния мелатонина на процессы регенерации кожи, особенно ее биохимических и морфологических параметров.

### **Список литературы**

1. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 376 с.
2. Kozeltsev V.L., Volodina T.V., Guseva V.V., Kostyk N.V. Characteristics of Changes in Lipids of Granulation Fibrous Tissue of Rats Subjected to Different Doses and Modes of Melatonin Administration // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2007. Vol. 1, № 3. P. 220-224.
3. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, № 5. P. 497-509.
4. Ким Рен Хва Влияние мелатонина на биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани крыс: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М, 2000. 18 с.

5. Арушанян Э.Б. Мелатонин: биология, фармакология, клиника: монография / Э.Б. Арушанян, Э.Б. Бейер. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2015. – 396 с.