

УДК 612.018:612.015:612.75

**В. Я. Березовський<sup>1</sup>, І. Г. Літовка<sup>1</sup>, С. П. Весельський<sup>2</sup>, Т. М. Заморська<sup>1</sup>, Р. В. Янко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ

<sup>2</sup> Інститут фізіології імені Петра Богача Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ

## **ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ НА ЛІПІДНИЙ ТА АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ОРГАНІЧНОГО МАТРИКСУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

---

*Досліджувався вплив екзогенно введеного мелатоніну на ліпідний та амінокислотний склад органічного матриксу у 11- і 15-місячних щурів-самців лінії Wistar. Відмічено вірогідне підвищення концентрації загальних фосфоліпідів у 11- і 15-місячних тварин на 19 % і 26 % відповідно. Екзогенний мелатонін у концентрації 1 мг на 1 кг маси тіла вірогідно знижує концентрацію цистину на 35 %, орнітину на 59 %, лізину на 33 % у кістковій тканині 11-місячних щурів. У 15-місячних щурів спостерігалось вірогідне зниження концентрації серину і аспарагінової кислоти на 29 %. Висловлено припущення, що екзогенний мелатонін опосередковано впливає на кістковий метаболізм шляхом підвищення вмісту полярних ліпідів та зниження вільних амінокислот. Це свідчить про активацію процесів ремоделювання кісткової тканини та інтенсифікацію в ній процесів синтезу колагену.*

---

### **ВСТУП**

Професійна діяльність людини у космічному польоті проходить в незвичайних умовах. Вплив гіпергравітації на старті і при спуску з орбіти, тривале перебування в умовах мікрогравітації і замкненого простору, гіпокінезія та гіподинамія напружують адаптивні системи організму та змінюють фізіологічний перебіг метаболічних процесів. Перебудова кісткової тканини (КТ) за відсутності гравітації супроводжується певними змінами спочатку в органічному, а потім і неорганічному матриксі, що створює загрозу здоров'ю екіпажу.

Виходячи з загальнобіологічних міркувань та на підставі раніше проведених досліджень ми звернули увагу на мелатонін. Він належить до циркадно-залежних регуляторів метаболізму та кальцієвого гомеостазу кістки і секретується шишкоподібною залозою. Його клітини розміщуються у сітківці ока, шлунково-кишковому тракті, кістковому мозку [1, 16]. Функціонально всі клітини, що продукують ме-

латонін, мають стосунок до так званої дифузної нейроендокринної системи, універсальної системи адаптації і підтримки гомеостазу організму. Головними ефектами цього гормону на кісткову тканину є: стимулювання диференціації та активації остеобластів, зниження диференціації остеокластів, нейтралізація утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових та неколагенових білків кісткового матриксу [1, 12, 14].

Проте є протилежні гіпотези щодо впливу мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини та роль остеобластів у цьому процесі. Островська та ін. виявили кореляцію між високими концентраціями мелатоніну у плазмі крові щурів-самців лінії Вістар і низькими рівнями маркерів формування кістки [13]. У роботі дослідженні аналізувались ефекти мелатоніну на культуру остеобластів у присутності остеокластів. При цьому спостерігалось пригнічення активності обох типів клітин, що дозволило зробити висновок про встановлення балансу між ними.

У нашій попередній роботі [2] виявлено вірогідне зниження для дорослих щурів активності лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові у 1.6 рази порівняно з контролем, тоді як у КТ актив-

---

© В. Я. БЕРЕЗОВСЬКИЙ, І. Г. ЛІТОВКА, С. П. ВЕСЕЛЬСЬКИЙ,  
Т. М. ЗАМОРСЬКА, Р. В. ЯНКО, 2012

ність цього ферменту була у 2.4 вірогідно вищою за вихідні дані. Тобто, можливе стимулювання синтезу як колагену I типу, так і неколагенових білків.

Таким чином, постає питання, чи може екзогенний мелатонін, введений у фізіологічних дозах, змінити метаболізм кістки і вплинути на її формування?

Мета цієї роботи дослідити вплив екзогенного мелатоніну на ліпідний та амінокислотний склад органічного матриксу кісткової тканини дорослих щурів.

## МЕТОДИКА

Досліди тривалістю 28 діб виконано у весняний період на 42 щурах-самцях лінії Вістар віком 11 та 15 місяців. Саме весна характеризується не тільки авітамінозом, а і перебудовою світлового режиму, що відображається на діяльності епіфізу. Протягом експерименту всі тварини перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природним циклом світло/темрява (тривалість освітлення з 6:30 до 17:30) і мали вільний доступ до води.

Тваринам досліджуваної групи перорально у дозі 1 мг/кг маси тіла вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну (Unipharm Inc., США) о 17:00, тобто у той час, коли його фізіологічна концентрація була мінімальною. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води.

Загальний стан тварин та інтенсивність метаболізму кісткової тканини контролювали за допомогою біохімічних методів дослідження. Досліди провадили з виконанням міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин.

Матеріалом для досліджень були свіжовидалені стегові кістки щурів та сироватка крові, які одержували від декапітованих підраш-наркозом тварин. У сироватці крові щурів методом імуноферментного аналізу за допомогою стандартних наборів реактивів визначали С-термінальні пропептиди колагену I типу (CICP) (IDS Inc., США), С-термінальні телопептиди колагену I типу ( $\beta$ -CrossLaps) (IDS Inc., США), піридинолін («Quidel Corporation», США). Методом тонкошарової хроматографії визначали концентра-

цію вільних амінокислот у сироватці крові та КТ і ліпідів у КТ.

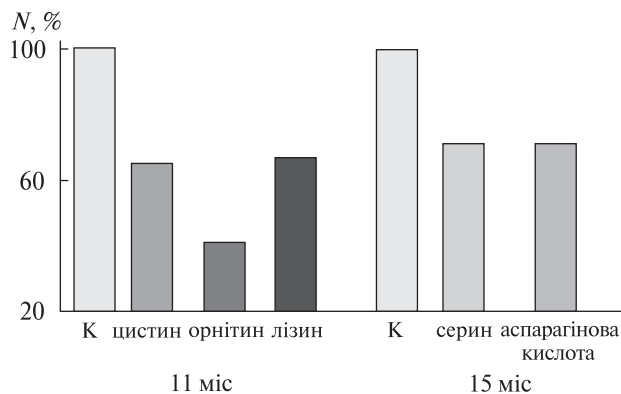
Для визначення основних фракцій ліпідів у КТ стегову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку КТ (100 мг) знежирювали і зневоднювали у спирт:ацетоні (1 : 2) [8]. Потім спирт:ацетон випарювали, а сухий залишок ліпідів розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ-бензол-ацетон (1 : 2 : 1) і наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем. Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводили на фабрично виготовлених пластинах Silufol (ЧССР) розміром 15 × 15 см, попередньо активуючи їх впродовж 1 години в термостаті при 110 °С. В цей же час у хроматографічну камеру для кращого насичення вносять фільтрувальний папір і наливають суміш розчинників: гексану, діетилового ефіру та оцтової кислоти (7 : 23 : 1) [3].

Для визначення амінокислотного складу у КТ знежирену і зневоднену стегову кістку піддавали гідролізу при 100 °С 20 хвилин у розчині 0.04 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1 : 10). Центрифугували 30 хв при 3 000 об/хв. Супернатант випарювали при 40–60 °С і розчиняли в 0.1 мл 50 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . Наносили на розмічену хроматографу мікрошприцем по 20 мкл. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт, бутиловий спирт, оцтову кислоту, мурашину кислоту та воду (9 : 7 : 4 : 25 по об'єму) [5, 6].

Цифрові дані обробляли з використанням пакету програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2003. Для оцінки вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували t-критерій Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У всіх органах і тканинах ссавців відбуваються вікові зміни структури і функцій. Однією з перших гальмується спроможність до синтезу колагену. Швидкість утворення або руйнування органічного матриксу КТ можна оцінювати при вимірюванні специфічних ферментів кісткоутворювальних чи кісткоруйнівальних клітин, таких як лужна та кисла фосфатаза, що ми і зробили у нашій роботі [2]. Але можна йти й іншим шляхом, визначаючи компоненти, які над-



**Рис. 1.** Достовірні зміни концентрації *N* вільних амінокислот у кістковій тканині контрольних та дослідних груп щурів (рівень вірогідності  $P > 0.95$ )

ходять в кровоток під час синтезу чи резорбції кістки.

Під час позаклітинного перетворення колагену I типу, перш ніж відбудеться збір фібрил, від його молекули відщеплюються аміно- та карбоксикінцевий пептиди. Ці пептиди циркулюють у крові. Колаген у найбільшій концентрації міститься у КТ. Через те що швидкість метаболізму тут значно вища, ніж у деяких інших видах сполучної тканини (наприклад у хрящі), то, можливо, головним постачальником С-термінального про- та телопептидів колагену I типу, піридиноліну у біологічних рідинах є саме КТ.

Однак при визначенні цих показників у сироватці крові 11- та 15-місячних щурів ми спостерігали лише тенденцію до їхнього зниження в цілому по групі після введення мелатоніну.

Проте достовірні зміни складу вільних амінокислот як у КТ, так і в сироватці крові відбувалися. Встановлено, що концентрація вільних амінокислот, найбільш значущих для сполучної тканини, синтезу колагену, змінювалася по-різному. Ми відзначимо тільки ті з них, що змінювалися достовірно (рівень вірогідності  $P > 0.95$ ). Так, зменшилася відносно контрольних значень концентрація цистину (зміцнює сполучну тканину) на 35 % у КТ 11-місячних щурів, орнітину — на 59 %, а вміст лізину, дефіцит якого гальмує синтез білка у сполучній тканині і безпосередньо бере участь у синтезі колагену — на 33 %. У сироватці крові цих тварин знизилася

концентрація серину і аспарагінової кислоти на 26 %, а валіну і триптофану — на 33 % (рис. 1).

У 15-місячних тварин у КТ знизився на 29 % вміст серину і аспарагінової кислоти. У той же час у сироватці крові зросла 39 % концентрація цистеїну і цистину, на 45 % — орнітину і глюкозаміну, на 57 % — аргініну і гістидину, на 43 % — лізину і аспарагіну, на 15 % — гліцину і метіоніну, на 32 % — серину і аспарагінової кислоти, на 25 % — аланіну, на 28 % — валіну і триптофану.

Із вищенаведеного випливають щонайменше три висновки.

1. Екзогенний мелатонін у концентрації 1 мг на 1 кг маси тіла не впливає на тело- і пропептиди колагену I типу та піридинолін органічного матриксу КТ.

2. Екзогенний мелатонін у зазначеній дозі впливає на склад вільних амінокислот КТ, у тому числі цистину і лізину, які безпосередньо беруть участь у синтезі колагену. Це свідчить про те, що мінімальна концентрація речовини виникає в місці її інтенсивного поглинання. Тому знижений рівень цих амінокислот вказує на інтенсифікацію процесів синтезу колагену органічного матриксу КТ.

3. Між змінами у пулі вільних амінокислот у КТ та сироватці крові після впливу екзогенного мелатоніну виявлено складну нелінійну залежність.

Ліпіди є важливою складовою сполучної тканини. Проте їхню роль у мінералізації кісткової тканини вивчено недостатньо. Зокрема це стосується ролі білково-ліпідних комплексів у процесах остеогенезу, в утворенні ядер кристалізації.

Ліпідні фракції у стегновій кістці контрольних 11-місячних щурів розподілялися наступним чином: 28 % припадало на загальні фосфоліпіди, 31 % — на загальний холестерин, 20 % — на тригліцериди і 21 % — вільні жирні кислоти. Співвідношення між цими фракціями у загальному пулі ліпідів 1.1:1.2:0.8:0.9. При порівнянні даних контрольної і дослідної груп тварин цього віку було виявлено вірогідне підвищення концентрації фосфоліпідів на 19 %, зниження вмісту загального холестерину і вільних жирних кислот відповідно на 22.4 % і 23.0 %. Зміна вмісту загального холестерину відбувалася за рахунок вільно-

го холестерину, концентрація якого знижувалася на 26 % ( $P < 0.05$ ) відносно контрольних значень (рис. 2, а).

Все це призвело до перерозподілу ліпідних фракцій у КТ досліджуваної групи тварин: 35 % припадало на загальні фосфоліпіди, 25 % — на загальний холестерин, 22 % — на тригліцериди і 18 % — вільні жирні кислоти. Відповідно змінювалося і співвідношення між ліпідними фракціями як 1.4:1.0:0.9:0.7.

У контрольних 15-міс. щурів розподіл ліпідних фракцій відбувався таким чином: 33 % припадало на загальні фосфоліпіди, 30.4 % — на загальний холестерин, 18.5 % — на тригліцериди і 18.1 % — вільні жирні кислоти, або 1.3:1.2:0.8:0.7. Спрямованість змін ліпідних фракцій у 15-місячних щурів після впливу мелатоніну була такою ж, як і у 11-місячних тварин (рис. 2, б).

Але ліпідні фракції у загальному пулі ліпідів розподілялися дещо інакше: 38 % припадало на загальні фосфоліпіди, 28 % — на загальний холестерин, 19 % — на тригліцериди і 15 % — вільні жирні кислоти, або 1.5 : 1.1 : 0.7 : 0.6.

Таким чином, зміни вмісту вільних амінокислот та ліпідних фракцій і їхній розподіл у загальному пулі ліпідів у дорослих 11- і 15-місячних щурів після впливу мелатоніну були односпрямованими, але мали свої особливості. Більш виражені зміни відбувалися у 11-місячних тварин. Це дозволяє висловити припущення, що екзогенний мелатонін опосередковано впливає на кістковий метаболізм шляхом підвищення вмісту полярних ліпідів та зниженням вільних амінокислот, які беруть безпосередню участь у синтезі колагену. Отримані результати добре узгоджуються з літературними даними, де показано, що мелатонін посилює синтез колагенових і неколагенових білків органічного матриксу КТ [12], стимулює процеси мінералізації [10, 11]. Вірогідність саме такого механізму дії мелатоніну можна віднести за рахунок того, що саме полярні ліпіди, або, вірніше, білок-ліпідні комплекси забезпечують зв'язок між органічним і неорганічним матриксом [7, 9]. За останніми даними із компактної кістки бика було виділено супрамолекулярний комплекс, який складався з рівних долей колагену, кальційзв'язувальних білків і полярних ліпі-

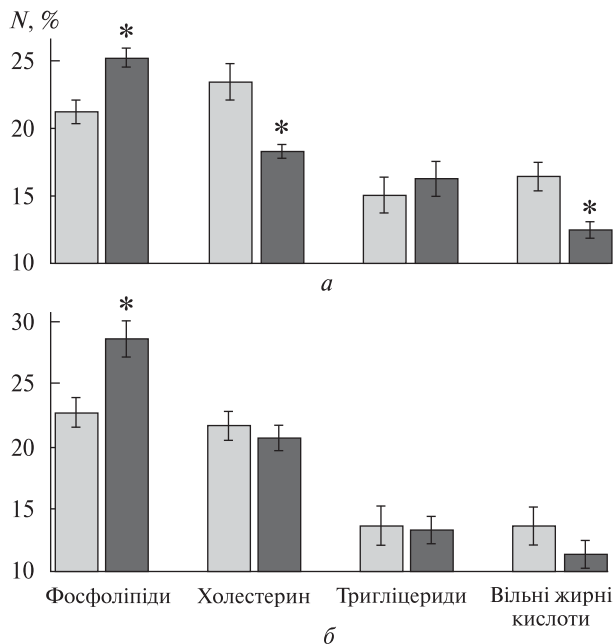


Рис. 2. Достовірні зміни ліпідних фракцій у контрольних і дослідних щурів: а — 11-місячних, б — 15-місячних (рівень вірогідності  $P > 0.95$ )

дів, що стимулюють преципітацію ортофосфатів кальцію і їхню трансформацію в гідроксиапатит, який зумовлює жорсткість кістки [4].

Отримані нами дані свідчать, що після впливу екзогенного мелатоніну у 11- і 15-місячних тварин збільшувалась концентрація загальних фосфоліпідів та зменшувалась концентрація вільних амінокислот, що беруть участь у синтезі колагену. Це забезпечує умови для підвищення здатності фосфоліпідів приєднувати кальцій та інші катіони, посилює зв'язок між полярними ліпідами і білком, забезпечує повноцінне функціонування КТ.

1. Анисимов В. Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. — СПб.: Изд-во «Система», 2007. — 40 с.
2. Березовський В. Я., Литовка І. Г., Косточенко О. С., Янко Р. В. Вплив мелатоніну на процеси фізіологічної регенерації кісткової тканини молодих і дорослих щурів // Космічна наука і технологія. — 2008. — 14, № 3. — С. 75—81.
3. Деклараційний пат. на винахід № 33564А. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / С. П. Весельський, П. С. Лященко, С. І. Костенко та ін. — Заявл. 11.03.99; Опубл. 15.02.01 // Бюл. — 2001. — № 1.

4. Десятниченко К. С., Леонтьев В. К. Супрамолекулярный комплекс внеклеточного матрикса костной ткани, инициирующий биологическую минерализацию // Вестн. Российской Акад. мед. наук. — 2009. — № 8. — С. 40—44.
5. Казначеева А. И., Злыднев Н. З. Содержание свободных аминокислот у практически здоровых лиц в плазме крови, эритроцитах и моче // Лаб. дело. — 1976. — № 8. — С. 479—480.
6. Коробейникова Э. М., Мещерякова Г. В. Определение содержания свободных аминокислот в сыворотке крови и моче здоровых детей // Лаб. дело. — 1981. — № 4. — С. 221—224.
7. Леонтьев В. К., Десятниченко К. С., Левченко В. Т. О роли белковой матрицы и других факторов в биологическом обызвестлении // Белки и ферменты в клинических и экспериментальных исследованиях. — Омск, 1977. — С. 46—49.
8. Петровский В. И., Регеранд Т. И., Лизенко Е. И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови // Лаб. дело. — 1986. — № 6. — С. 339.
9. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. — Л.: Медицина, 1969. — 375 с.
10. Cardinali D. P., Ladizesky M. G., Boggio V. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives // J. Pineal Res. — 2003. — N 34. — P. 81—87.
11. Cutando A., Gomez-Moreno G., Arana C., et al. Melatonin: Potential functions in the oral cavity // J. Periodontol. — 2007. — 78, N 6. — P. 1094—1102.
12. Nakade O., Koyama H., Arijji H., et al. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro // J. Pineal Res. — 1999. — 27, N 2. — P. 106—110.
13. Ostrowska Z., Wolkowska-Pokrywa K., Kos-Kudla B., et al. Melatonin and bone status // Pol. Merkur. Lekarski. — 2006. — 21, N 124. — P. 389—93.
14. Roth J. A., Byung-Gook Kim, Fei Song, et al. Melatonin promotes osteoblasts differentiation and bone formation // J. biol. chemistry. — 1999. — 274, N 45. — P. 22041—22047.
15. Sanchez-Barcelo E. J., Mediavilla M. D., Tan D. X., Reiter R. J. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis // J. Osteoporosis. — 2010. — N 1. — 10 p.
16. Wolden-Hanson T., Mitton D. R., McCants R. L., et al. Daily melatonin administration to middle-Aged Male Rats Suppresses Body Weight, Intraabdominal Adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat // Endocrinology. — 2000. — 41, N 2. — P. 487—497.

Надійшла до редакції 12.03.12

V. A. Berezovskii, I. G. Litovka, S. P. Veselskii,  
T. M. Zamorska, R. V. Yanko

#### EXOGENOUS MELATONIN INFLUENCE ON LIPID AND AMINO ACID COMPOSITION OF BONE'S ORGANIC MATRIX

We consider the influence of exogenous melatonin on lipid and amino acid composition of the organic matrix for 11- and 15-month Wistar male-rats. Our study shows a significant increase in the concentration of total phospholipids for 11- and 15-month animals by 19 % and 26 %, respectively. The exogenous melatonin in a dose of 1 mg/kg b. w. significantly reduces the concentration of cystine (by 35 %), ornithine (by 59 %), and lysine (by 33 %) in the bone tissue of 11-month rats. For the 15-month rats, a reliable decrease in the concentration of serine and aspartic acid by 29 % is observed. We believe that exogenous melatonin has an indirect effect on bone metabolism by increasing polar lipids and by reducing free amino acids. This points to the activation of bone remodeling processes and to collagen synthesis intensification.