

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет медицина
Катедра по физиология и патофизиология
УНС по патофизиология

д-р Минка Христова Александрова

ПРОУЧВАНЕ НА ВЪЗМОЖНИ МЕХАНИЗМИ
ЗА УВРЕЖДАНЕ НА СТОМАШНАТА
ЛИГАВИЦА И ВЛИЯНИЕТО
НА МЕЛАТОНИНА ПРИ МОДЕЛ
НА ТЕРМИЧНА ТРАВМА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

По научна специалност „Патофизиология”, код 03.01.05

Научен ръководител

Доц. д-р Ганка Бекярова, дмн

Официални рецензенти:

Проф. д-р Адриана Бочева, дм

Доц. д-р Мария Цанева, дм

Варна, 2016

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Физиология и патофизиология при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 152 страници, 41 фигури и 2 таблици. Цитирани са 491 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на

..... от часа в

.....

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	5
ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	12
1. Експериментални процедури и прилагане на мелатонин	12
2. Приготвяне на тъканен хомогенат и парафинови блокчета от стомашна лигавица	13
3. Използвани методи	13
СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	18
1. Степен на оксидативно увреждане на стомашната лигавица	18
2. Антиоксидантна защита в стомашната лигавица	20
3. Степен на оксидативно увреждане на плазма	23
4. Определяне нивото на някои възпалителни маркери (цитокини) и iNOS при термична травма и ролята на мелатонина във възпалителния процес	25
5. Изследване степента на експресия на HO-1 в стомашната лигавица и влиянието на мелатонина	29
6. Изследване степента на експресия на транскрипционния фактор Nrf2 в стомашна лигавица и ефекта на мелатонина	30
7. Определяне съдържанието на про- и антиапоптотични протеини в стомашната лигавица при термична травма и установяване ефекта на мелатонина	32
8. Морфологично изследване на стомашната лигавица и влияние на мелатонина при термична травма – светлинна микроскопия	36
ОБСЪЖДАНЕ	40
1. Степен на оксидативно увреждане и антиоксидантна защита на стомашната лигавица при термична травма и повлияването им от мелатонина	40
2. Про- и антивъзпалителни медиатори и ролята на мелатонина като модулатор на възпалителния отговор при термична травма	47
3. Про- и антиапоптотични протеини и патоморфологични промени в стомашната лигавица и ефект на мелатонина при термична травма	52
4. Експресия на транскрипционния фактор Nrf2 и ролята му за повишаване на антиоксидантния капацитет, потискане на възпалението, апоптозата и увреждането на стомашната лигавица при термична травма и ефект на мелатонина	60

ИЗВОДИ.....	64
ПРИНОСИ.....	66
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	68

СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

И/Р	Ишемия и реперфузия
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства
ПК (UA)	Пикочна киселина (Uric acid)
ТТ	Термична травма
4-HNE	4-hydroxynonenal (4-хидрохиноненал)
AFMK	N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine
АМК	N-acetyl-5-methoxykynuramine
AP-1	Activated protein -1 (активатор протеин-1)
Araf-1	Апоптотичен фактор
ARE	Antioxidant Response Element (Антиоксидант респонсен елемент)
Вах	Проапоптотичен протеин
Bcl-2	Антиапоптотичен протеин
Bid	Про-апоптотичен протеин
СО	Carbon monoxide (въглероден монооксид)
COX-2	Cyclo oxygenase-2 (циклооксигеназа-2)
CRP	C-reactive protein (С-реактивен протеин)
E(L)I	Erosive (lesion) index (Ерозивен (лезионен) индекс)
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (ендотелна азотоксидна синтаза)
ER	Ендоплазмен ретикулум
GCL	glutamate cysteine ligase (глутамат цистеин лигаза)
GSH	Glutathione (глутатион)
GST	Glutathione S трансфераза (глутатион- S трансфераза)
GPx	Glutathione peroxidase (глутатион пероксидаза)
HO-1	Heme-oxygenase-1 (хемоксигеназа-1)
HSP-32	Heat shock protein 32
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (междуклетъчна адхзионна молекула)
IkB	Инхибитор на NF-kB

IL-10	Interleukin-10 (интерлевкин-10)
IL-6	Interleukin-6 (интерлевкин-6)
iNOS	Inducible nitric oxide synthase-(индуцируема ендотелна азотоксидна синтаза)
JAK/STAT	Janus/ Signal Transducer and Activator of Transcription) сигнален път
Keap1	Инхибитор на Nrf2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (митоген активирана протеин киназа)
MCP-1	Macrophage chemotactic protein (макрофажен хемотаксисен протеин)
MDA	Malon dialdehyde (малонов диалдехид)
MPO	Myeloperoxidase (миелопероксидаза)
mtDNA	Mitochondrial DNA (митохондриална ДНК)
NF- κ B	Nuclear factor kappa B (нуклеарен фактор капа В)
NO	Nitric oxide (азотен оксид)
Nrf2	Нуклеарен еритроиден фактор
ONOO	Peroxynitrite (пероксинитрит)
p38MAPK	p38 mitogen activated protein kinase (p38 митоген активирана протеин киназа)
PAPR	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PP(ПЗ)	Percentage protection (Процент на защита)
RNS	Reactive nitrogen species (реактивни нитрозативни форми)
ROS	Reactive reactive species (рактивни форми на кислорода)
SOD	Superoxide dismutase (супероксид дисмутаза)
TBA	Thiobarbituric acid (тиобарбитурова киселина)
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha (тумор некротизисен фактор алфа)
Trx	Thioredoxin (тиоредоксин)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1 (съдовоклетъчна адхзионна молекула)

ВЪВЕДЕНИЕ

Проблемът с термичната травма е актуален в медицинската наука и остава един от основните за интензивната клинична практика. При тежка термична травма, освен местни увреждания, възникват нарушения във функциите и структурата на органи, отдалечени от мястото на действие на термичния агент. Сериозно засегната е и храносмилателната система, в това число и стомаха. Още през 1942 г. Curling описва остра дуоденална язва при пациенти с обширни изгаряния и в негова чест язвите са наречени Кърлингови язви (*Pruitt BA Jr & Goodwin CW Jr, 1981*). Смъртността при пациенти с Кърлингови язви през първите 24 часа е висока (*Pruitt BA Jr et al., 1970*). Те представляват 54% от общия брой на коремните усложнения (*Markell KW et al., 2009*), а в 57% от случаите, се налага профилактика на язвите при термична травма (*Barletta JF et al., 2002*). Други увреждания, индуцирани от термичната травма са гастроинтестинални хеморагии, дилатация, забавено изпразване на стомаха и увеличена стомашна секреция (*Çakir B et al., 2004; Markell KW et al., 2009*). Патолофизиологичните механизми, лежащи в основата на увреждане на стомашната лигавица, са сложни, многофакторни и ненапълно изяснени.

Термичното увреждане на кожата предизвиква локална деструкция на тъканите и освобождаване на цитокини от възпалителните клетки, които попадайки в циркулацията, предизвикват системен възпалителен отговор. Системното възпаление и повишената продукция на цитокини активира левкоцитите и секвестрирането им в отдалечени от термичната травма органи, включително и в стомашната лигавица. Повишената продукция на протеази, свободни радикали и цитокини е един от възможните механизми за вторични органни поражения.

Бързо настъпващата хиповолемия, генерализираният вазоспазъм,

редуцираният кръвоток в спланхниковата област при термична травма предизвикват дисбаланс между защитните и агресивни фактори в стомаха. Намалява продукцията на простагландини и на други протективни фактори, както и на антиоксидантната защита на стомашната лигавица (*Brzozowski T et al., 1997; Zhu L et al., 2000*). Повишената продукция на свободни радикали, цитокини и други медиатори от възпалителните клетки, на фона на намалената антиоксидантна защита, вероятно е един от основните патогенетични механизми на увреждане на стомашната лигавица при термична травма (*Suzuki H et al., 2012; Işeri SO et al., 2008; Sehirli O et al., 2008*).

Освен увреждащо тъканите действие, свободните радикали играят важна роля на сигнални молекули, които активират транскрипционни нуклеарни фактори, регулиращи експресията както на медиатори на клетъчното увреждане и смърт, така и на гените за клетъчна защита.

Мелатонинът е индолово съединение, срещано във всички организми - от най-низшите до най-висшите и при човека. Секретира се основно в епифизната жлеза, но и от други органи, включително от стомашната лигавица. Мелатонинът е мощен ендегенен антиоксидант. Липофилната му структура допринася за лесна и пасивна дифузия през клетъчните мембрани, и достигайки до митохондриите и ендоплазмения ретикулум ги предпазва от липидна пероксидация и увреждане. Нивото на мелатонина намалява в условия на оксидативен стрес поради изчерпването му като антиоксидант. Освен това мелатонинът проявява противовъзпалително, антиапоптоично и стимулиращо регенерацията действие (*Brzozowska I et al., 2002*). Има доказан протекторен ефект при увреждания на стомашната лигавица, индуцирани от различни фактори – стрес, етанол, исхемия, нестероидни противовъзпалителни средства (*Konturek PC et al., 1997; Konturek PC et al., 1997a; Brzozowski T PC et al., 1997*). Проучването на

ефектите на мелатонина върху възпалителния отговор, апоптозата и анти-оксидантната защита е важно с оглед на изучаване на патофизиологичните механизми на увреждане на стомашната лигавица при термична травма. Задълбочените познания върху клетъчно-молекулярните механизми на увреждане на стомашната лигавица при термична травма би допринесло за подобряване лечението и прогнозата на пациенти с изгаряне.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да се изследват някои патогенетични механизми на тъканна алтерация на стомашната лигавица при експериментална термична травма и гастропротективното действие на мелатонина.

Във връзка с поставената цел са определени следните задачи:

1. Да се изследва степента на оксидативно увреждане чрез определяне нивото на малондиалдехид (MDA), 4 хидроксиноненал (4-HNA), и да се проучи ролята на антиоксидантната защита чрез определяне на Cu/Zn SOD, пикочна киселина и общи тиоли (в стомашна лигавица и плазма).
2. Да се проучи влиянието на мелатонина върху оксидативния стрес и антиоксидантната защита в стомашна лигавица и плазма.
3. Да се изследва възпалителния отговор в острия период след ТТ чрез определяне нивото на провъзпалителния маркер TNF- α и антивъзпалителния маркер IL-10 в плазма, да се определи баланса между про- и антивъзпалителни медиатори TNF- α /IL-10 в плазма, и индуцируемата азотоксид синтаза (iNOS) в стомашната лигавица.
4. Да се проучи влиянието на мелатонина върху възпалителния отговор.
5. Да се изследва експресията на ензима хем-оксигеназа-1 в стомашната лигавица и връзката му с показатели на оксидативния стрес и възпалението при ТТ и ефекта на мелатонина.
6. Да се определи експресията на транскрипционния фактор Nrf2 в стомашната лигавица при ТТ като важен показател за цитопротекция и повлияването му от мелатонина.
7. Да се изследват апоптозата в стомашната лигавица чрез определяне ек-

пресията на проапоптотичния Вах протеин и антиапоптотичния Bcl-2 протеин и тяхното съотношение.

8. Да се проучи антиапоптотичното действие на мелатонина в стомашната лигавица при ТТ.
9. Да се проучат макро- и микроскопските промени в стомашната лигавица при ТТ чрез определяне на ерозивния (лезионен) индекс на стомашната лигавица и влиянието на мелатонина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Експериментални процедури и прилагане на мелатонин

Използвани са 120 бели мъжки плъха порода Wistar с тегло 250-280g на възраст между 10 и 12 седмици. Плъховете са отглеждани при температура 20-25°C и имат свободен достъп до храна и вода. Всички опитни процедури са провеждани съобразно националната нормативна база за работа с експериментални животни и са в съответствие с директивите на Европейския съюз.

Животните са разпределени в три групи: 1) Sham (контрола) (K); 2) животни с термична травма (ТТ); 3) животни с ТТ, третирани с мелатонин (ТТ+М). На животните преди ТТ е приложена обща анестезия с тиопентал 30 mg/kg интраперитонеално (i.p.). Термична травма е предизвикана на добре застригана кожа с гореща вода (90°C, 10 sec) на площ 20 % от общата телесна повърхност. Тя е последвана от вливане на 4 mL физиологичен разтвор, приложен интраперитонеално. Кожата на гърба на Sham животните се потапя във вода с температура 37°C. На всички животни се прилага buprenorphine в доза 0.3 mg/kg i.p. два пъти дневно.

Мелатонин (N-acetyl-5 methoxy-tryptamine) (Merck, Germany) в еднократна доза 10 mg/kg (разтворен в 0.5 mL физиологичен разтвор съдържащ 0.1 mL 1% етанол) е приложен i.p. между 8.00 и 9.00 часа непосредствено след ТТ и на 12 часа след ТТ. Литературните данни показват, че прилаганата доза от 10 mg/kg мелатонин е оптимална и ефектът се получава на 24 ч и при експериментална ТТ (*Sener G et al., 2002*) и други модели на увреждане на стомашната лигавица (*Cabeza J et al., 2001*). След инжектиране на анестетика е взета кръв за изследване от вена югуларис на 24 час след ТТ.

2. Приготвяне на тъканен хомогенат и парафинови блокчета от стомашна лигавица

Стомашната лигавица се отпрепарира веднага и поставя в студен физиологичен разтвор. Кръвта се центрофугира за пет минути при 1000 x g и всички проби се съхраняват при температура -80°C.

Един грам тъкан се хомогенизира в 10 ml 50mM фосфатен буфер, съдържащ 0.1 mM EDTA, за 2-3 min при 4000 rpm. Полученият хомогенат се центрофугира при 3000 rpm, 10 min, 4°C за отделяне на грубата утайка. Супернатантата е допълнително центрофугирана при 10000 rpm за 10 min при 4° C.

За хистологичното и имунохистохимично изследване са използвани тъканни късчета (2/0.5 cm), фиксирани веднага в 10% неутрален формалин (pH 7.2), дехидратирани в етилов алкохол (70-100%) и включени в парафин. Тъканните срези с дебелина 5µ се оцветяват с хематоксилин и еозин (H&E) и са наблюдавани с помощта на светлинен микроскоп Olympus BH-2, Токио, Япония.

3. Използвани методи

3.1. Биохимични и клинично-лабораторни методи за оценка на степента на оксидативно увреждане и антиоксидантна защита

3.1.1. Определяне съдържанието на малонов диалдехид

Ендогенният продукт на липидната пероксидация *малонов диалдехид* (MDA) (плазма и хомогенат от стомашна лигавица), реагиращ с тиобарбитурова киселина (ТВА) е определен по спектрофото-метричния метод на Porter N, (1976). Резултатите са изчислени чрез използване на моларен екстинкционен коефициент на MDA-ТВА-комплекс при 532nm= $1.56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ и са представени като nmol MDA/mL плазма и nmol MDA/g тъкан.

3.1.2. Определяне нивото на тоталните тиоли

Съдържанието на тотални тиоли (T-SH) в плазма и в хомогенат от стомашна лигавица е определено по адаптиран спектрофотометричен метод на *Hu M, (1994)*, основаващ се на способността на реактива на Ellman да взаимодейства с тиолатния анион. Като стандарт е използван разтвор на редуциран глутатион. Резултатите са изразени в $\mu\text{mol/mL}$.

3.1.3. Определяне нивото на пикочна киселина

Съдържанието на пикочната киселина (ПК) в плазма и в хомогенат от стомашна лигавица е изследвано по метода на *Bergmeyer HU (1981)*, базиран на свойството на уратите да редуцират фосфороволфрамовата киселина в алкален разтвор към синьо оцветен продукт. Стандартен разтвор на UA е използван за изчисление на степента нарастване на пикочната киселина в плазмата. Резултатите са представени като $\mu\text{mol/mL}$.

3.2. Имунологични методи

3.2.1. Определяне нивото на провъзпалителният цитокин TNF- α и противовъзпалителния цитокин IL-10 в плазма

Нивото на провъзпалителния цитокин TNF- α както и на противовъзпалителния цитокин IL-10 е определяно с търговски ELISA кит на Gen-Probe Diacclone SAS, Besancon Cedex, France. Резултатите са представени в pg/mL плазма.

3.2.2. Имунохистохимични методи

Чрез използване на имунохистохимични методи е определена експресията на: 4 хидроксиноненал (4-HNE), транскрипционен фактор Nrf2, хем-оксигеназа-1 (HO-1), антиапоптоичен Bcl-2 протеин, проапоптоичен Bax протеин, индуцируема NO-синтаза (iNOS) и Cu/Zn супероксид димутаза (Cu/ZnSOD) (Таблица 1).

Таблица 1. Използвани субстанции за имунохистохимични процедури.

Антитяло	Фирма	Разреждане
<i>4 hydroxynonenal</i>	<i>Abcam Cambridge, UK</i>	<i>1:200</i>
<i>Nrf2 (C-20)</i>	<i>Santa Cruz , USA</i>	<i>1:50</i>
<i>Heme oxygenase 1 (C-18)</i>	<i>Santa Cruz, USA</i>	<i>1:50</i>
<i>Bcl-2 (N-19)</i>	<i>Santa Cruz , USA</i>	<i>1:50</i>
<i>Bax (C-20)</i>	<i>Santa Cruz , USA</i>	<i>1:50</i>
<i>iNOS</i>	<i>DAKO, USA</i>	<i>1:50</i>
<i>Cu/Zn SOD</i>	<i>DAKO, USA</i>	<i>1:50</i>

Имунохистохимичното изследване е извършено с моно- или поликлонални антитела върху парафинови срези с FLEX Mini kit high ph DAKO K8024. Визуализацията се извършва използвайки the horse-radish peroxidase-conjugated DAKO staining system (DAKO InVision, Carpenteria, CA).

Определяне интензивността на имунната реакция

В зависимост от количеството на отложения имуноген преципитат в отделените клетки, те се разпределят като:

- Негагивни клетки (липсва отложен преципитат) 0;
- Слаба по интензивност имунна реакция 1;
- Умерена по интензивност имунна реакция 2;
- Изразена по интензивност имунна реакция 3.

Морфометричното изследване е извършено върху 100 клетки от всяка проба в зоните на най-интензивна реакция. Интензивността на имунната реакция е представена като средна стойност *Tzaneva MA, (2001)*.

3.3. Хистологични методи

3.3.1. Изчисляване на ерозивния (лезionen) индекс

Стомахът е разрязан по протежение на голямата кривина, внимателно е промит с физиологичен разтвор и е поставен върху филтърна хартия

върху твърда повърхност. Уврежданията на стомашната лигавица са отчетени без и с увеличителна лупа и ерозивният индекс (EI) се определя по метода, описан от *Srivastava SK et al., (1991)*.

Изчисляване на ерозивен индекс:

$$EI = EN + ES + EP \times 10^{-1}$$

EN - Среден брой ерозии на животно;

ES - Средна стойност от тежестта на увреждането;

EP - Процент на животни с ерозии.

3.3.2. Изчисляване на процент на защита (ПЗ) на мелатонина

Индексът на защита на дадено лекарство се изчислява по метода на *Srivastava SK et al., (1991)*:

$$ПЗ = (K_{ПЗ} - T_{ПЗ} / K_{ПЗ}) \times 100$$

$K_{ПЗ}$ - Средна стойност на тежестта на увреждането в контролната група (група с ТТ);

$T_{ПЗ}$ - Средна стойност на тежестта на увреждането в третираната с мелатонин група (група ТТ+М).

3.3.3. Светлинно микроскопско изследване - оцветяване с хематоксилин-еозин

За морфологична оценка на промените в стомашната лигавица.

3.4. Статистически методи

Резултатите са обработени по метода на вариационния, непараметричния (при неравномерно разпределение на данните) и графичен анализ. Резултатите са изразени като средна стойност (\bar{X}) \pm стандартната грешка на средната (SEM). При част от диаграмите стойностите са показани като 5^{ти} – 95^{ти} перцентил (box plot).

За изводи и заключения при сравняване на две средни са използвани

параметрични тестове, изискващи нормално или близко до нормалното разпределение нечифтен t-тест на Student (95% доверителен интервал), а при сравняване на повече от две средни за изучаване влиянието на различни фактори е приложен One Way ANOVA анализ. При различно от нормалното разпределение е използван непараметричен тест на Mann Whitney (U), използващ сравняване на медианни стойности. За статистически достоверни са приети различия при ниво на значимост $p < 0.05$. Използвани са статистическите програми Excel и GraphPadPrism 6 (Graph Pad Software, Inc).

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

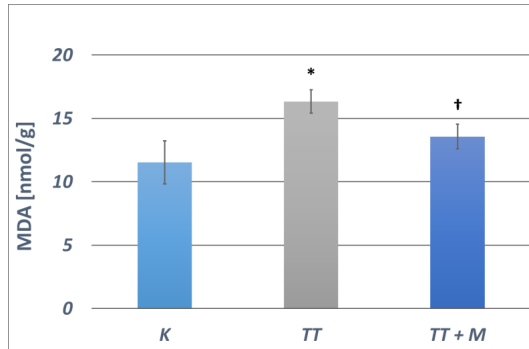
Изследване степента на оксидативно увреждане и на антиоксидантна защита на стомашната лигавица и плазма при термична травма и ефекта на мелатонина

1. Степен на оксидативно увреждане на стомашната лигавица

Малондиалдехид (MDA) и диалдехида 4-хидроксиноненал (4-HNE) са информативните маркери за оксидативно увреждане на стомашната лигавица.

1.1 Съдържание на малондиалдехид в хомогенат на стомах

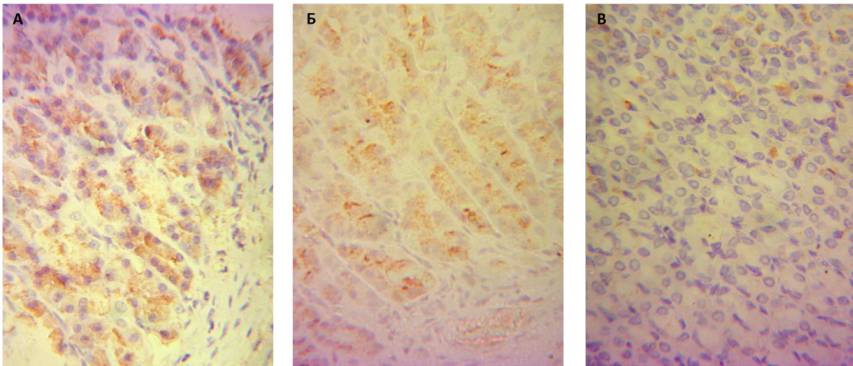
Съдържанието на MDA в стомашната лигавица се повишава с 42 % ($p < 0.05$) на 24 час след ТТ в сравнение с това на контролната група (фиг. 1). Нивото на MDA намалява с 20% ($p < 0.05$) в групата третирана с мелатонин спрямо тази след ТТ и достига до стойности близки до тези на контролната група.



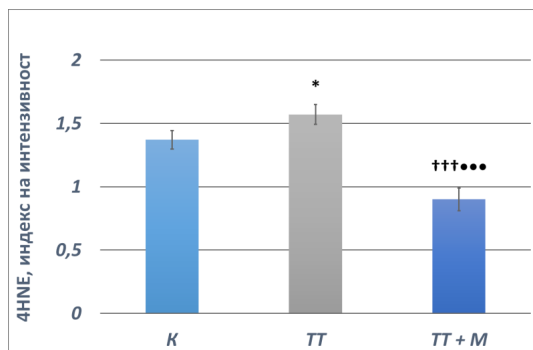
Фигура 1. Ефект на мелатонина върху нивото на MDA в стомашната лигавица при термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Резултатите са дадени като средна стойност \pm SEM. * $p < 0.05$ спрямо контролните животни; † $p < 0.05$ спрямо експериментална група.

1.2 Експресия на 4 - хидроксиноненал (4-HNE) в стомашната лигавица.

Имунохистохимичното изследване показва, че в контролната група 4-HNE се експресира в цитоплазмата на епителните клетки, предимно в базалната 1/3 на жлезите. Интензивността на реакцията е слаба до умерена. Средното цитоплазмено съдържание е 1.37 ± 0.071 (фиг. 2 А) В групата с термична травма 4 HNE позитивни клетки също се откриват в базалните отдели на жлезите. Интензивността на реакцията е слаба до умерена. Епителните клетки в горните отдели на стомашните жлези обикновено са негативни (фиг. 2 Б). Средната стойност на цитоплазмената експресия в клетките се увеличава с 15% спрямо тази в контролната група (1.57 ± 0.078) ($p < 0.05$) В групата с термична травма и мелатонин цитоплазмената експресия на 4-HNE е силно редуцирана (фиг. 2 В). Средната стойност на 4-HNE в клетките е 0.9 ± 0.089 , с 43% ($p < 0,0001$) по-ниска спрямо тази в групата с термична травма. Средното съдържание на 4-HNE в стомашната лигавица графично е представено на фигура 3.



Фигура 2. Имунохистохимичен анализ на 4-HNE в стомашната лигавица на контролни животни (А), с ТТ (Б) и в групата ТТ+М (В). Интензивността на имунната реакция нараства в стомашната лигавица в групата с ТТ (Б). Мелатонинът достоверно намалява експресията на 4-HNE в групата ТТ+М (В) в сравнение с ТТ групата. Представителни данни. Оригинално увеличение x200.



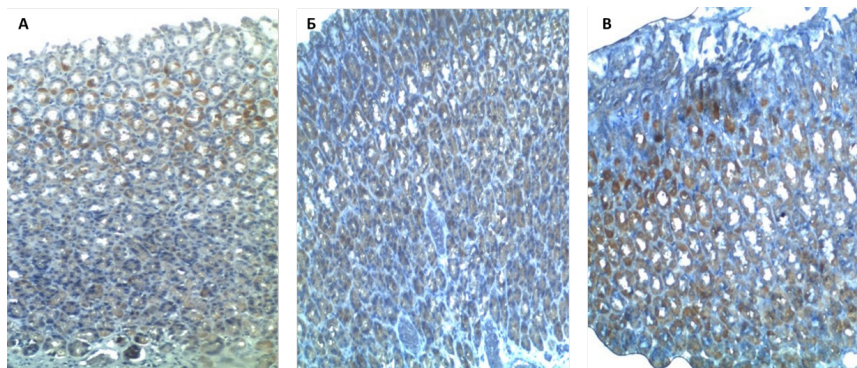
Фигура 3. Средно съдържание на 4-HNE в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът намалява експресията на 4 HNE спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност, * $p < 0.05$ спрямо контролните животни; ••• $p < 0.0001$ спрямо контролната група; ††† $p < 0.0001$ спрямо ТТ група.

2. Антиоксидантна защита в стомашната лигавица

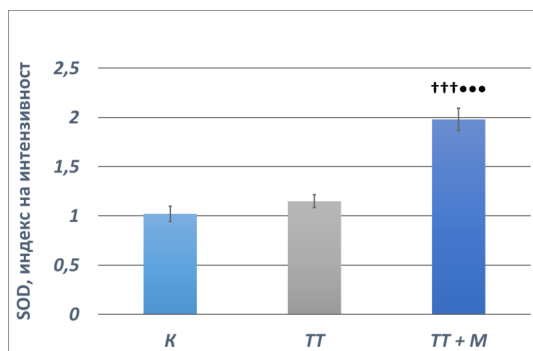
2.1 Експресия на ензима Cu/Zn супероксиддисмутаза в стомашната лигавица

Cu/Zn SOD - позитивните клетки в контролната група са локализирани във всички отдели на стомашната лигавица, но предимно в горната ѝ половина. Интензивността на оцветяване за Cu/Zn SOD е силно проявена в клетките от горната половина на стомашната лигавица и слабо проявена в базалните ѝ части (фиг. 4 А). Средното съдържание на Cu/Zn SOD в тези клетки на стомашната лигавица е 1.02 ± 0.078 . В групата с ТТ експресия на Cu/Zn SOD се намира в почти всички епителни клетки, т.е. дифузно в стомашната лигавица. Интензивността е слаба (фиг. 16 Б). Средното съдържание на Cu/Zn SOD протеин е повишено с 13% (1.15 ± 0.066 ; $p > 0.05$) в сравнение с контролната група. В групата с ТТ и мелатонин експресията на Cu/Zn SOD има в почти всички клетки на стомашната лигавица и варира от силна в гората част до умерена степен в базалната ѝ половина (фиг. 4 В). Средното съдържание на Cu/Zn

SOD протеин (1.98 ± 0.11) е увеличено със 72% и 94% ($p < 0.0001$), съответно спрямо това в ТТ групата и животните от К групата. Средното съдържание на Cu/Zn SOD в стомашната лигавица графично е представено на фигура 5.



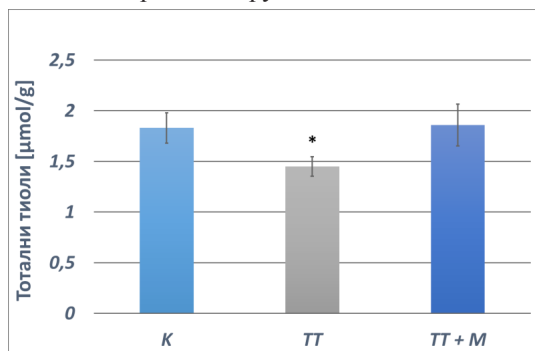
Фигура 4. Имунохистохимичен анализ на Cu/ZnSOD в стомашната лигавица на контролни животни (А), животни с ТТ (Б) и в групата ТТ+М (В). Интензивността на имунната реакция е повишена в епителните клетки от стомашната лигавица на 24 час след ТТ. Средното съдържание на ензима в стомашната лигавица след въвеждане на мелатонин значително се увеличава спрямо това при контролната група. Представителни данни. Оригинално увеличение x200.



Фигура 5. Средно съдържание на Cu/ZnSOD в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на Cu/ZnSOD спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност, *** $p < 0.0001$ спрямо ТТ група; ••• $p < 0.0001$ спрямо контролната група.

2.2 Ниво на тотални тиоли в хомогенат на стомах

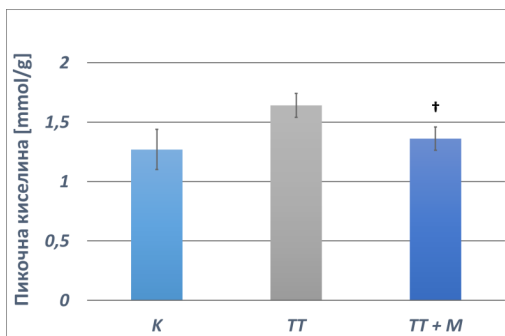
Нивото на тоталните тиоли (T-SH) в тъканен хомогенат намалява в ТТ-групата в сравнение с контролната група с 29 % ($p < 0.05$) на 24 час (фиг. 6). В групата третирана с мелатонин нивото на тиоловите групи в стомаха се повишава с 28% ($p < 0.001$) спрямо това на групата с ТТ и се доближава до това в контролната група.



Фигура 6. Ефект на мелатонина върху нивото на тоталните тиоли в стомашната лигавица след термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ спрямо контролните животни.

2.3 Ниво на пикочна киселина в хомогенат на стомах

Нивото на ПК в тъканен хомогенат нараства в ТТ-групата в сравнение с контролната група с 29 % ($p < 0.05$) на 24 час (фиг. 7). В групата третирана с мелатонин нивото на пикочната киселина в стомаха се понижава със 17% ($p < 0.05$) спрямо това на групата с ТТ и се доближава до това в контролната група.

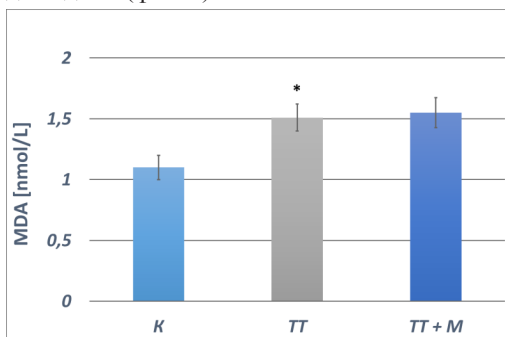


Фигура 7. Ефект на мелатонина върху нивото на пикочна киселина в стомашната лигавица след термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. $\ddagger p < 0.05$ спрямо експерименталната група.

3. Степен на оксидативно увреждане на плазма

3.1 Съдържание на малондиалдехид в плазма

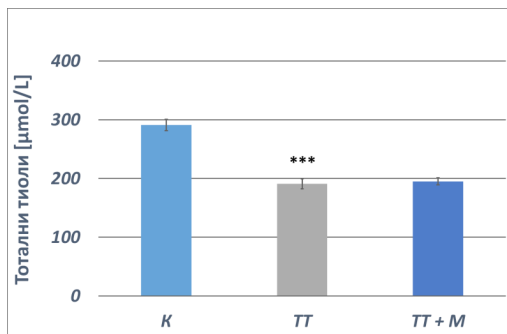
Плазменото ниво на MDA се повишава след ТТ с 37% ($p < 0.05$) в сравнение с това на контролните животни. Прилагането на мелатонин понижава плазмените нива на MDA без достигане на статистическа значимост в острия период след ТТ (фиг. 8)



Фигура 8. Ефект на мелатонина върху нивото на MDA в плазма след термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Резултатите са дадени като mean \pm SEM. $*p < 0.05$ спрямо контролните животни.

3.2. Ниво на тотални тиоли в плазма

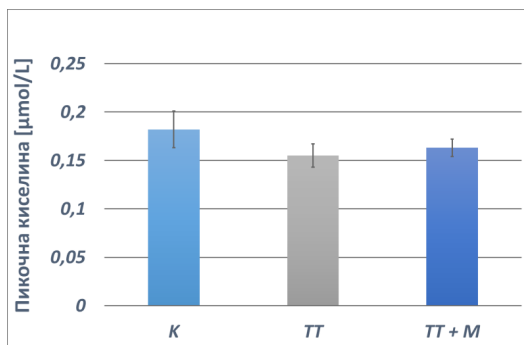
Плазменото ниво на тиоловите групи намалява достоверно с 35 % ($p < 0.05$) в групата с термична травма в сравнение с това на контролната група (фиг. 9). Мелатонинът не променя достоверно нивото на тиоловите групи след ТТ в сравнение с това на ТТ групата.



Фигура 9. Влияние на мелатонина върху плазмените нива на тоталните тиоли след термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност, *** $p < 0.001$ спрямо контролните животни.

3.3. Ниво на пикочна киселина в плазма

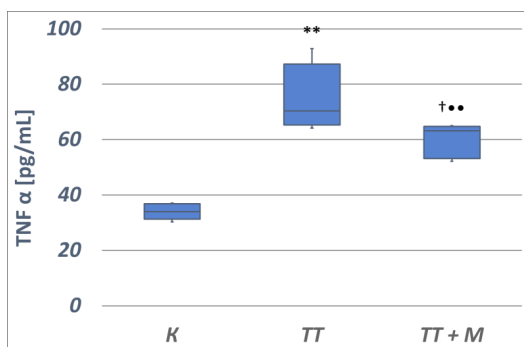
Плазменото ниво на пикочната киселина (ПК) в ТТ група намалява с 12% спрямо това в контролната група, но разликите не са статистически достоверни. В ТТ+М групата концентрацията на ПК в плазмата не се различава достоверно от това на ТТ групата (фиг. 10).



Фигура 10. Ефект на мелатонина върху нивото на пикочна киселина в плазма след термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност.

4. Определяне нивото на някои възпалителни маркери (цитокини) и iNOS при термична травма и ролята на мелатонина във възпалителния процес

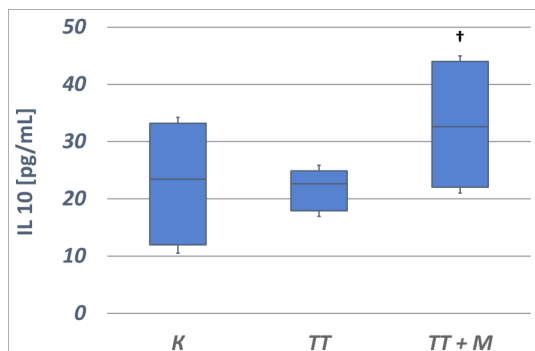
4.1. Изследване на провъзпалителния медиатор TNF- α при термична травма и влиянието на мелатонина



Фигура 11. Влияние на мелатонинът върху нивото на провъзпалителния цитокин TNF- α при термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като медиана (median value), най-голямата и най-малката стойност (min-max) и интервала между 25%-75%. ** $p < 0.01$ спрямо контролните животни; † $p < 0.01$ спрямо експерименталната група; †† $p < 0.01$ спрямо контролните животни.

Провъзпалителният медиатор TNF- α е повишен със 115 % ($p < 0.0001$) в плазмата на ТТ групата в сравнение с контролната група (фиг. 11). При третиране с мелатонин концентрацията на TNF- α в плазма намалява с 41% спрямо тази в ТТ групата ($p < 0.01$), но остава по-висока със 74 % спрямо концентрацията в контролната група ($p < 0.0001$).

4.2. Изследване на антивъзпалителния медиатор IL-10 при термична травма и влиянието на мелатонина



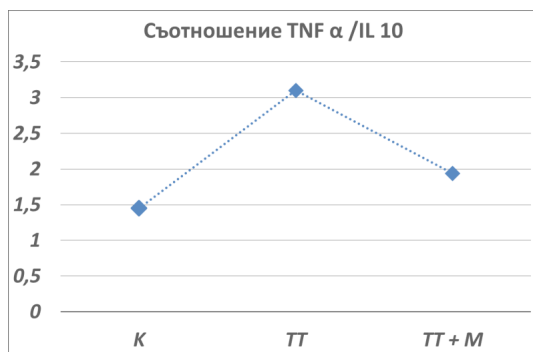
Фигура 12. Влияние на мелатонинът върху нивото на антивъзпалителния цитокин IL-10 при термична травма. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като медиана (median value), най-голямата и най-малката стойност (min-max) и интервала между 25%-75%. † $p < 0.05$ спрямо експерименталната група; †† $p < 0.01$ спрямо контролните животни.

Нивото на антивъзпалителния цитокин IL-10 в плазмата не се променя достоверно в ТТ групата спрямо това на контролната група (фиг. 12). Мелатонинът повишава нивото на IL-10 в плазма с 50% ($p < 0.01$) спрямо това на ТТ група и то е достоверно по-високо от това в контролната група.

4.3. Изследване на съотношението между про – и антивъзпалителни цитокини (TNF- α /IL-10) при термична травма.

В експерименталната група съотношението TNF- α /IL-10 е повишено със 114% спрямо това в контролната група. В експерименталната група,

третирана с мелатонин това съотношение намалява с 37% и показва тенденция за възстановяване към изходните нива в контролната група (фиг. 13).

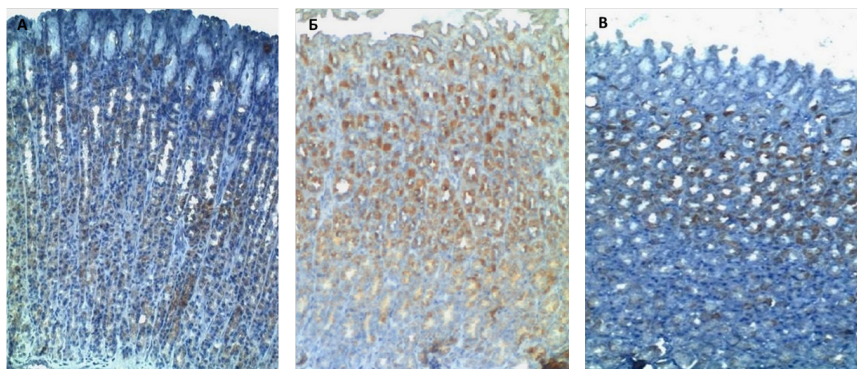


Фигура 13. Ефект на мелатонина върху съотношението между про – и анти – възпалителни цитокини (TNF- α /IL-10) при термична травма. Резултатите са дадени като съотношение между медианите. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин.

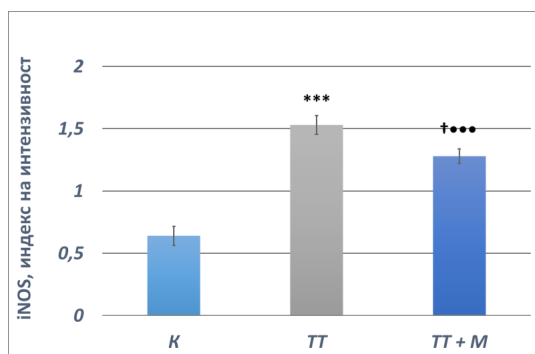
4.4 Изследване на индуцируемата NO-синтаза (iNOS) в стомашна лигавица при термична травма и влиянието на мелатонина

При контролната група iNOS позитивни клетки се откриват предимно в долната половина на стомашните жлези. Експресията е цитоплазмена и слабо изразена. Средната стойност на iNOS е 0.64 ± 0.077 (фиг. 14 А) В групата с термична травма експресия на iNOS се открива главно в цитоплазмата на епителните клетки от горните отдели на стомашните жлези. Преобладава умерената по интензивност реакция със средна стойност 1.53 ± 0.076 , която е по-висока със 139% от тази в контролната група ($p < 0.0001$) (фиг. 14 Б). В групата с термична травма и мелатонин експресия на iNOS се намира предимно в цитоплазмата на епителните клетки в горната половина на стомашната лигавица Интензивността на оцветяване в iNOS е слаба до умерена (фиг. 14 В). Средната стойност на iNOS в клетките е по-висока от тази на контролата със 100% (1.28 ± 0.059 , $p < 0.0001$), но е по-

ниска от тази на групата с изгаряне (16%, $p < 0.05$). Средното съдържание на iNOS в стомашната лигавица графично е представено на фигура 15.

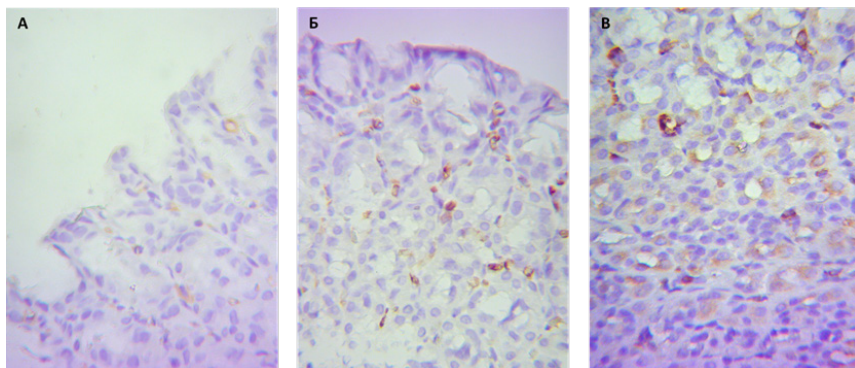


Фигура 14. Имунохистохимичен анализ на iNOS в стомашната лигавица; контролна група (А), животни с ТТ групата (Б) и ТТ+М групата (В). Интензивността на имунната реакция е силно увеличена в стомашната лигавица на 24 ч след ТТ. След прилагане на мелатонин съдържанието на iNOS протеин се понижава в групата ТТ+М спрямо ТТ, но остава по-високо от това на контролната група. Представителни данни. Оригинално увеличение x200.



Фигура 15. Средно съдържание на iNOS в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на iNOS спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. *** $p < 0.0001$ към контролната група; † $p < 0.05$ към ТТ групата; *** $p < 0.0001$ към контролната група.

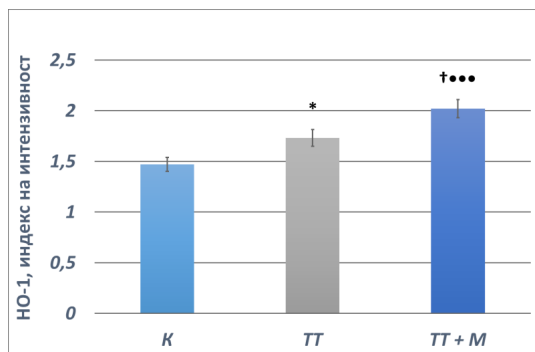
5. Изследване степента на експресия на HO-1 в стомашната лигавица и влиянието на мелатонина



Фигура 16. Имунохистохимичен анализ на експресията на хем-оксигеназа-1 (HO-1) в стомашна лигавица; контролни животни (А), животни с ТТ (Б) и в групата ТТ+М (В). Интензивността на ензимната реакция нараства в ендотелните клетки на стомашната лигавица в групата с ТТ. Мелатонинът повишава достоверно експресията на HO-1 спрямо групата с ТТ. Представителни данни. Оригинално увеличение x200.

В контролната група HO-1 показва слаба експресия в ендотелните клетки на съдовете от малък калибър, локализиращи се в горната част на лигавицата. Средното съдържание на HO-1 в клетките е 1.47 ± 0.077 (фиг. 16 А). В групата с термична травма съдържанието на HO-1 в ендотелните клетки е умерено. Интензивността на имунната реакция е 1.73 ± 0.082 и е по-висока с 18% ($p < 0.05$) от тази в контролната група (фиг. 16 Б). Освен в ендотелните клетки в групата ТТ+М, HO-1 се експресира и в епителни клетки (фиг. 16 В). Интензивността на реакцията на HO-1 е умерена до висока. Средното съдържание на протеина в стомашната лигавица е 2.02 ± 0.09 , което е със 17% ($p < 0.05$) по-високо от това в ТТ група и е значително по-висока (37%, $p < 0.0001$) в сравнение с тази на контролните плъхове (фиг. 16 А). Намира се в ендотелните и епителни клетки, средното съдържание на HO-1 протеин в стомашната лигавица е 2.02 ± 0.09 , което е със 17% ($p < 0.05$) по-високо от това в ТТ група и е значително по-висока

(37%, $p < 0.0001$) в сравнение с тази на контролните пльхове (фиг. 16 В). Средното съдържание на HO-1 в стомашната лигавица графично е представено на фигура 17.

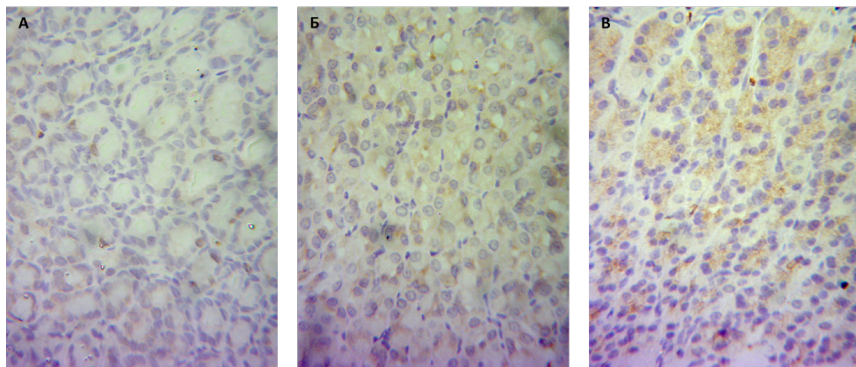


Фигура 17. Средно съдържание на HO-1 в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на HO-1 спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; † $p < 0.05$ спрямо ТТ групата; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група.

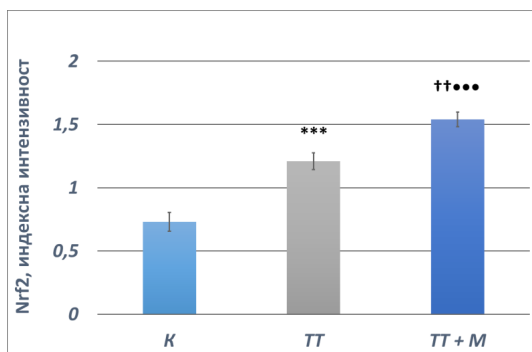
6. Изследване степента на експресия на транскрипционния фактор Nrf2 в стомашна лигавица и ефекта на мелатонина

Имунохистохимичният анализ показва, че транскрипционният фактор Nrf2 се експресира в цитоплазмата и ядрата на епителните клетки на жлезите в контролната група. Интензивността на реакцията е слаба. Средното цитоплазмено съдържание е 0.73 ± 0.074 (фиг. 18 А). В групата с термична травма експресията на Nrf 2 протеин е предимно в цитоплазмата на епителните клетки на стомашната лигавица. Интензивността на реакцията е слаба до умерена 1.21 ± 0.03 и е със 66% по-висока спрямо тази в контролната група ($p < 0.0001$) (фиг. 18 Б). Nrf2 се открива в почти всички клетки на стомашната лигавица след третиране с мелатонин. Преобладава умерена експресия и средната стойност на Nrf 2 в клетките (1.54 ± 0.058) е по-висока в

сравнение с двете групи (27% спрямо групата с ТТ ($p < 0.001$) и 111% спрямо контролната група ($p < 0.0001$) (фиг. 18 В). Средното съдържание на Nrf2 в стомашната лигавица графично е представено на фигура 19.



Фигура 18. Иммунохистохимичен анализ на Nrf2 в стомашна лигавица на контролни животни (А), животни с ТТ (Б) и групата ТТ+М (В). Интензивността на ензимната реакция нараства статистически значимо в групата с ТТ на 24 h. Мелатонинът повишава достоверно експресията на Nrf2 в цитоплазмата на епителните клетки спрямо тази в ТТ групата. Представителни данни. Оригинално увеличение $\times 200$.

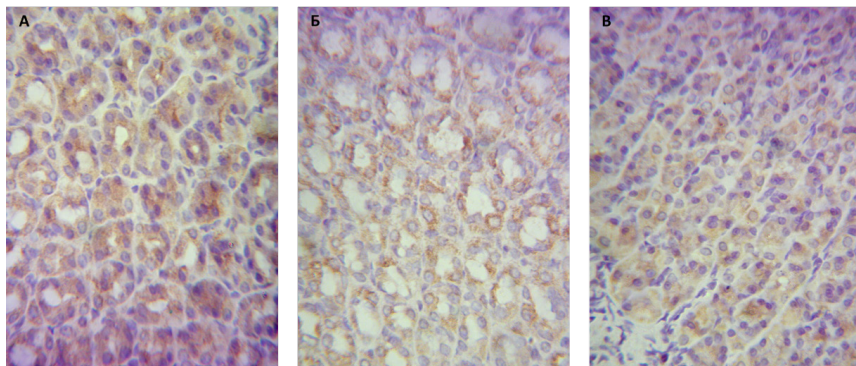


Фигура 19. Средно съдържание на Nrf2 в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на Nrf2 спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. *** $p < 0.0001$ спрямо контролната група; †† $p < 0.001$ спрямо ТТ групата; •• $p < 0.0001$ спрямо контролната група.

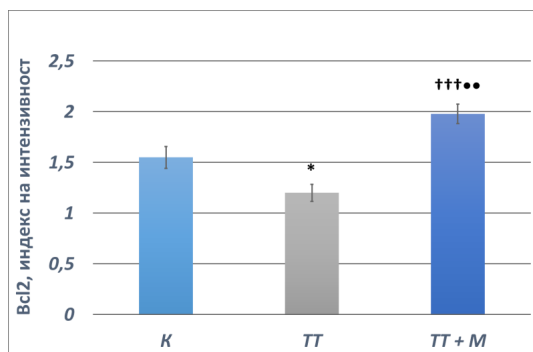
7. Определяне съдържанието на про- и антиапоптоични протеини в стомашната лигавица при термична травма и установяване ефекта на мелатонина

7.1. Изследване степента на експресия на антиапоптоичния Bcl-2 протеин

При контролната група експресия на Bcl-2 се открива в ядрата на покривния епител и в цитоплазмата на епителните клетки, предимно в базалните отдели на стомашната лигавица (фиг. 20А). Средната цитоплазмена експресия е 1.518 ± 0.052 . В групата с термична травма експресията на Bcl-2 е по-дифузна и се открива в ядрото и цитоплазмата на стомашните епителни клетки. Интензивността на реакцията в цитоплазмата е по-слаба в сравнение с контролната група (фиг. 20 Б). Средната стойност на експресията е 1.145 ± 0.044 и е статистически значимо по-ниска с 23% от тази в контролната група ($p < 0.05$). В групата с термична травма и мелатонин цитоплазмена експресия на Bcl-2 протеина се открива в почти всички клетки на стомашната лигавица (фиг. 20 В). Средните стойности на цитоплазмената експресия на Bcl-2 в клетките е 1.928 ± 0.046 . Реакцията за Bcl-2 е по-висока в сравнение с двете групи (65% спрямо ТТ групата ($p < 0.0001$), 28% спрямо контролната група ($p < 0.01$)). Средното съдържание на Bcl-2 в стомашната лигавица графично е представено на фигура 21.



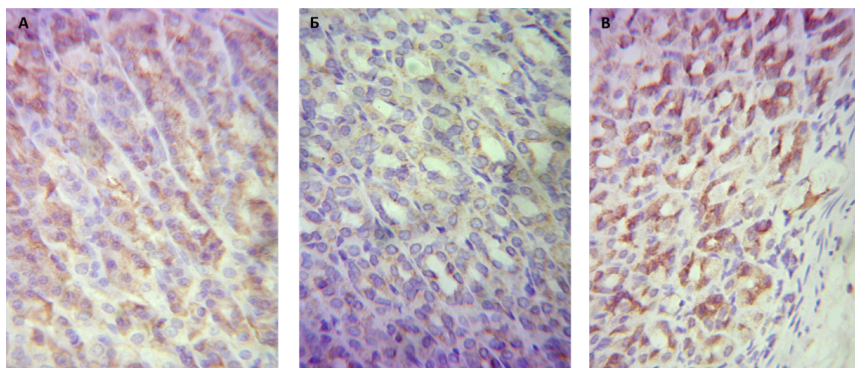
Фигура 20. Имунохистохимичен анализ на експресията на ензима Vcl-2 в стомашна лигавица на контролни животни (А), животни с ТТ (Б) и групата ТТ+М (В). Интензивността на ензимната реакция не се променя статистически значимо в групата с ТТ на 24 h след ТТ. Мелатонинът повишава достоверно експресията на Vcl-2 след ТТ. Представителни данни. Оригинално увеличение x200.



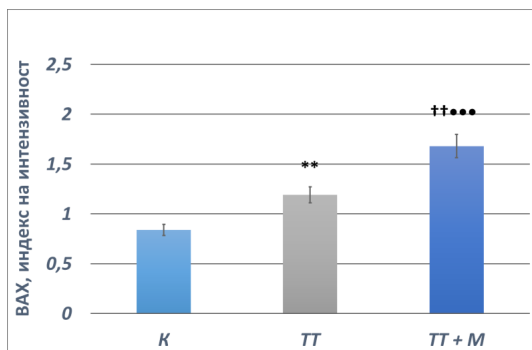
Фигура 21. Средно съдържание на Vcl-2 в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на Vcl-2 спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; ††† $p < 0.0001$ спрямо ТТ групата; •• $p < 0.01$ спрямо контролната група.

7.2. Изследване степента на експресия на про-апоптотичния Вах протеин

Резултатите от имунохистохимичното изследване показват, че в контролната група експресия на Вах се открива в цитоплазмата на епителните клетки предимно в базалните отдели на жлезите (Фиг. 22 А). Средната стойност на експресията е 0.84 ± 0.056 . В групата с термична травма експресията на Вах е по-силно изразена в сравнение с контролната група (Фиг. 22 Б). Средната стойност на експресията е 1.19 ± 0.08 и тя е статистически значимо по-висока с 42% от тази в контролната група ($p < 0.01$). В групата с термична травма и мелатонин експресия на Вах протеина се открива в цитоплазмата на повечето епителни клетки от стомашната лигавица (Фиг. 22 В). Средните стойности на експресията на Вах в клетките е 1.68 ± 0.12 . Реакцията за Вах е по-висока в сравнение с двете групи (41% спрямо ТТ групата ($p < 0.01$), 100% спрямо контролната група; $p < 0.0001$). Средното съдържание на Вах в стомашната лигавица графично е представено на фигура 23.



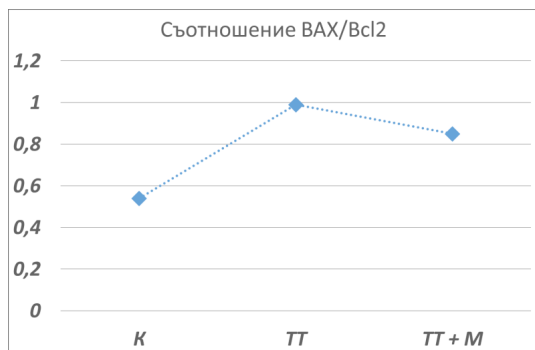
Фигура 22. Имунохистохимичен анализ на експресията на про-апоптотичния протеин Вах в стомашна лигавица на контролни животни (А), животни с ТТ (Б) и в групата ТТ+М (В). Интензивността на ензимната реакция се повишава в епителиоцитите в групата с ТТ и допълнително нараства достоверно при въздействие с мелатонин. Представителни данни. Оригинално увеличение $\times 200$.



Фигура 23. Средно съдържание на Вах в стомашната лигавица при термична травма и влияние на мелатонина. Мелатонинът повишава експресията на Вах спрямо групата с ТТ. К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин. Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност. ** $p < 0.01$ спрямо контролната група; †† $p < 0.01$ спрямо ТТ групата; ††† $p < 0.0001$ спрямо контролната група.

7.3. Промени в индекса Вах/Vcl-2 в стомашна лигавица при термична травма

Както се вижда Вах/Vcl-2 индексът се повишава с 83% в ТТ групата в сравнение с този от контролната група. След третиране с мелатонин Вах/Vcl-2 индекс намалява спрямо този на ТТ група (с 14%) с тенденция за доближаване до този на контролната група (Фиг. 24).

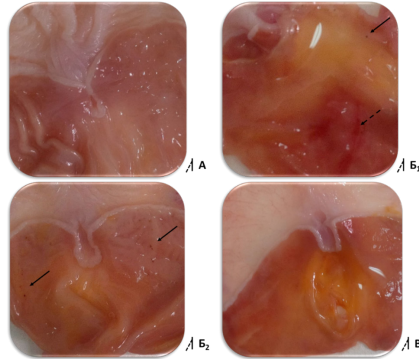


Фигура 24. Промени в експресията на Vcl-2 и Вах протеините (индекс на интензивност) и отношението Вах/Vcl-2 в стомашна лигавица на контролни животни (А), с ТТ (Б) в групата ТТ+М (В). К, Контроли; ТТ, Експериментална група; ТТ+М, Експериментална група, третирана с мелатонин.

8. Морфологично изследване на стомашната лигавица и влияние на мелатонина при термична травма – светлинна микроскопия

8.1. Макроскопски промени на стомашната лигавица.

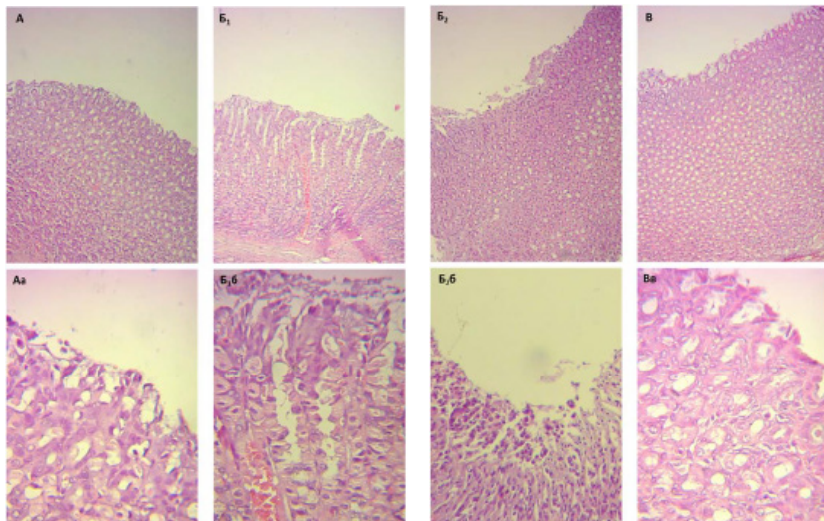
Лигавицата на стомаха в контролната група е бледо-розова и със запазен лигавичен релеф (Фиг. 25 А). В групата с ТТ има изразена хиперемия на стомашната лигавица с повърхностни разязвявания, разположени предимно по повърхността на лигавичните гънки. Дъното на разязвяванията е кафеникаво на цвят (Фиг. 25 Б). В групата, третирана с мелатонин (ТТ+М) липсват повърхностни разязвявания, само в отделни участъци лигавицата е с хиперемия (Фиг. 25 В). Представителни данни.



Фигура 25. Макроскопски промени на стомашната лигавица и ефекта на мелатонина при ТТ. Репрезентативни данни. Контролна група (А); експериментална група с ТТ (Б1, Б2); експериментална група, третирана с мелатонин (В). Представителни данни. Стрелките показват макроскопските промени на стомашната лигавица: ↗ хиперемия, ↙ разязвявания.

8.2. Микроскопски промени на стомашната лигавица при термична травма.

Стомашната лигавица на контролната група е със запазена архитектура. Покривният и жлезистия епител не показват видими микроскопски промени (Фиг. 26 А, Аа). В групата с ТТ в стомашната лигавица се установяват циркулаторни нарушения (съдова конгестия), дегенеративни промени и загуба на покривния епител, огнищна деструкция на жлезистия епител до степен на формиране на остри ерозии с наличие на клетъчен детрит и неутрофили в съседство на ерозиите (Фиг. 26 Б₁, Б_{1б}, Б₂, Б_{2б}). В групата, третирана с мелатонин (ТТ+М) покривният и жлезист епител в по-голяма част от стомашната мукоза изглеждат непроменени (Фиг. 26 В, Вв). Представителни данни.



Фигура 26. Хистологично изследване на стомашната лигавица и влиянието на мелатонин при ТТ. Представителни данни. Контролна група (А, Аа); експериментална група с ТТ (Б₁, Б₁а; Б₂, Б₂а); експериментална група, третирана с мелатонин (В, Ва). Оцветяване с Н&Е. Оригинално увеличение x100, 200.

8.3. Ерозивен (лезионен) индекс (ЕИ) и процент на защита (ПЗ) на стомашната лигавица при термична травма.

В групата с термична травма ЕИ нараства достоверно със 150 единици в сравнение с контролната група ($p < 0.0001$). Прилагането на мелатонин понижава ЕИ с 87% ($p < 0.0001$) (Фиг. 27). Мелатонинът проявява гастропротективен ефект в над 80% от случаите спрямо групата с ТТ (таблица 2).



Фигура 27. Промени в ерозивен (лезионен) индекс на стомашната лигавица и влиянието на мелатонин при ТТ. Контролна група (К); експериментална група с ТТ (ТТ); експериментална група, третирана с мелатонин (ТТ+М). Данните са представени като средна стойност \pm средна грешка на средната стойност.

Таблица 2. Ефект на мелатонина върху ерозивен (лезионен) индекс и протекцията на стомашната лигавица (Процент на защита) при ТТ. Контролна група (К); експериментална група с ТТ (ТТ); експериментална група, третирана с мелатонин (ТТ+М).

Група	Ерозивен (лезионен) индекс	Процент на защита [%]
К	0	-
ТТ	150,125	-
ТТ + М	27,875	81,43

ОБСЪЖДАНЕ

1. Степен на оксидативно увреждане и антиоксидантна защита на стомашната лигавица при термична травма и повлияването им от мелатонина

Нашите резултати показват, че нивата на MDA и 4-HNE са повишени, което е сигурен маркер за развитие на липидна пероксидация в стомашната лигавица. Мелатонинът повишава антиоксидантната защита и ограничава оксидативното увреждане след термичната травма.

Термичното увреждане на кожата предизвиква исхемия и последваща реперфузия в спланхниковата област, включително стомашната лигавица и вероятно чрез активиране на ксантин-ксантин оксидазата (ХО) стимулира продукцията на пикочна киселина и супероксидни радикали. Прилагането на алопуринол, като инхибитор на ХО (*Konturek PC et al., 2000*), както и на антиоксиданти, приложени след ТТ (*Hoşnuter M et al., 2004*) и при исхемия (*Cabeza J et al., 2001*) потискат повишената активност на ХО и индуцираното от кислородните радикали увреждане на тъканите. Уставеното от нас паралелно повишаване на нивата на MDA, 4-HNE и ПК (маркери на липидната пероксидация) в стомашната лигавица и ограничаването на това повишаване от мелатонина потвърждава нашето предположение. Освен това супероксидните радикали, продуцирани от ХО, улесняват инфилтрирането на праймирани левкоцити в стомашната лигавица и допълнително повишават екстрацелуларното генериране на радикали от тези клетки (*Lu YZ et al., 2012*). Левкоцитите, инфилтрирани в стомашната лигавица в отговор на термичен стрес, тъканно увреждане или системни възпалителни сигнали (системна възпалителна реакция) в по-късните часове и дни също са източник на ROS. Повишена MPO

активност и левкоцитна инфилтрация са установени в различни органи, отдалечени от мястото на изгаряне (*Işeri SO et al., 2008*). При активиране на мембранно свързания ензим NADPH левкоцитите продуцират големи количества ROS и RNS (*Fazal N et al., 1997; Fazal N et al., 1999*). Вероятно активираните левкоцити са другият основен източник на ROS/RNS в храносмилателната система, включително и стомаха.

Исхемията и реперфузията са причина за намаляване на енергопродукцията и за митохондриална дисфункция. Нарушен е митохондриалният редокс баланс, при което се генерират допълнително свободни радикали (*Padfield KE et al., 2005; Righi V et al., 2013; Zang Q et al., 2007; Zang QS et al., 2010*).

Ние установихме повишена експресия на антиоксидантните ензими Cu/Zn SOD и HO-1, което вероятно е свързано с повишеното генериране на свободни радикали в стомашната лигавица след ТТ.

Cu/Zn SOD е на първата линия на антиоксидантна защита в клетката. Тя обезврежда директно супероксидните радикали, които инициират свободно-радикалните процеси в клетката. Предполагаме, че активността на Cu/Zn SOD в стомашната лигавица се повишава вероятно като компенсаторна реакция и възможност да предотврати свръхпродукцията на супероксидните радикали и цитотоксичният пероксинитрит, получен при взаимодействието на $O_2^{\cdot-}$ с NO от активираната iNOS в макрофагите, в условията на медиерания от възпалението оксидативен стрес (*Bang RL et al., 2000*). Установено е, че антиоксидантът анакардинова киселина повишава активността на ензима SOD и ограничава индуцирано от липидната пероксидация увреждане (*Morais TC et al., 2010*), а екзогенно въведеният SOD има гастропротективен ефект при различни, увреждащи стомашната лигавица, фактори – индометацин (*Vaananen PM et al., 1991*), исхемия и реперфузия (*Konturek PC et al., 2000*).

НО-1 е индуцируемата изоформа на ензима хем-оксигеназа. Той се активира от фактори, предизвикващи оксидативен стрес – хипоксия, исхемия, провъзпалителни цитокини, азотен оксид и хем и се смята за маркер на оксидативния стрес (*Otterbein LE, 2000*). Може да се предположи, че при нашия експериментален модел на ТТ, повишената експресията НО-1 в стомашната лигавица вероятно е свързана със свръхпроизводството на свободни радикали и цитокини от възпалителните клетки, в условията на исхемия и последвала реперфузия. Друга вероятна причина за активирането на НО-1 е хемолизата на еритроцитите и повишена продукция на хем при тежки термични поражения (*Bekyarova G et al., 1989*). Активиране на стресовия ензим НО-1 настъпва и при други модели на мукозно увреждане, индуцирано от И/Р, етанол, НСПВС (*Attuwaybi BO et al., 2004; Gomes AS et al., 2010; Higuchi K et al., 2009*). Цитопротективният ефект на НО-1 се дължи на неговите продукти билирубин, СО и феритин. СО има противовъзпалителен ефект; билирубинът и желязо свързаният белтък феритин притежават антиоксидантни свойства. Съществуват доказателства, че НО-1 участва в защитата срещу възпаление и оксидативен стрес в различни патологични състояния (чернодробно увреждане, белодробно възпаление, вентилаторни нарушения, исхемия и реперфузия, невродегенеративни заболявания (*Farombi EO et al. 2006, Constantin M et al. 2012, Cuadrado A et al., 2008*). Ендогенният ензим НО-1, както и фармакологично индуцираната експресия на НО-1 (цинк-І-карнозин) могат да предпазят стомашната лигавица от увреждане (*Ueda K et al., 2009*).

Според нас повишената активност на антиоксидантните ензими Cu/ZnSOD и НО-1 не трябва да се приемат като проява на увеличена антиоксидантна защита, на фона на ниските нива на други антиоксиданти (тиоловите групи) в стомашната лигавица при ТТ. Свръхпродукцията на активни форми на кислорода и азота може да изчерпи антиоксидантния капацитет

и да предизвика оксидативен стрес (*Niki E et al., 2009; Babusikova E et al., 2013*). Установените от нас повишени нива на продуктите на липидна пероксидация (MDA и 4-HNE) в стомашната лигавица са доказателство за оксидативното увреждане при ТТ. Данните от литературата показват, че свободните радикали и образуваните алдехиди имат директен цитотоксичен ефект върху мембранните липиди, цитозолните протеини, DNA и предизвикват клетъчно увреждане (*Finkel T et al., 2011*). Те са способни да образуват ковалентни съединения с клетъчни протеини, да инактивират ензими и да инхибират синтеза на протеини. Продуктите на липидната пероксидация предизвикват оксидативна модификация на тиоловите групи в молекулата на глутатиона (*Niki E et al., 2009; Babusikova E et al., 2013*).

Глутатионът, като тиолов антиоксидант е протектор на стомашната лигавица при оксидативно увреждане. Ние установихме ниски стойности на тоталните тиоли в стомашната лигавица при ТТ. Известно е, че деплецията на редуцирания глутатион при термична травма се дължи на повишената консумация в условията на оксидативен стрес, а това може да предизвика нарушения в редокс-баланса и оксидативно увреждане на тъканите (*Niki E et al., 2009; Wu G, 2004*).

Пероксидацията на мембранните липиди и деградацията на мембранните протеини предизвикват увреждане на клетъчните и субклетъчните мембрани (митохондрии, ендоплазмен ретикулум) и дори клетъчна смърт - апоптоза или некроза (*Subrahmanyam M et al., 2003; Tamura M et al., 2013*). Данните от настоящото проучване показаха наличието на некроза, неутрофилна инфилтрация и остри ерозии, установени при хистологичното изследване. Тези морфологични промени са подобни на лезиите на стомашната лигавица, получени с участие на ROS и продукти на липидната пероксидация (MDA и 4-HNE) под действието и на други увреждащи агенти като етанол, НСПВС (*Amang PA et al., 2013*), студов имобилизационен стрес (*Izgüt-Uysal*

VN et al., 2014), исхемия и реперфузия (*Kwiecień S, 2014*).

Получените от нас резултати показват, че мелатонинът предотвратява почти изцяло хистопатологичните промени в стомашната лигавица, развиващи се при ТТ. Според нас протекцията на мелатонина е свързана с намаляване концентрацията на MDA и 4-HNE и повишаване нивото на SH-групи в стомашната лигавица. От друга страна ендогенните не-протеинови SH инактивират ROS/RNS (*Wu G et al., 2004*), което означава, че увеличаването на небелтъчните тиоли в стомашната лигавица, след лечение с мелатонин, може да послужи като алтернативен метод за защита срещу индуцираното от изгарянето оксидативно увреждане.

Ние установихме повишена експресия на антиоксидантните ензими Cu/Zn SOD и HO-1, което повишава антиоксидантния капацитет на стомашната лигавица. По този начин се ограничава стомашното увреждане, както показват данните от хистологичното изследване. Нашето изследване, както и резултатите от литературата показват, че мелатонинът повишава синтеза на други антиоксидантни ензими като Gpx и на глутатион (*Sener G et al., 2006*). Така мелатонинът възстановява редокс-баланса в стомашната лигавица и протектира срещу оксидативното увреждане, индуцирано от ТТ.

За разлика от класически антиоксиданти като витамин А и витамин Е, разположени в клетъчните мембрани, витамин С разположен предимно в клетъчния цитозол, мелатонинът свободно преминава в цитозола и на практика достига до всички субклетъчни структури и осъществява биологичните си ефекти (*Reiter RJ, 2002*). Той е „scavenger“ на различни свободни радикали - $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$ и редуцира техните нива. Тези качества притежават и продуктите, получени при метаболизирането му – AFМК и АМК (*Reiter RJ et al., 2007; Rodriguez C et al., 2004*). Мелатонинът е мощен активатор и на други антиоксидантни ензими (GPx, GRd, γ -глутамил цистеин

синтаза, глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа, каталаза). Допълнително стабилизира клетъчните мембрани, като по този начин ги прави по-устойчиви на оксидативни увреждания (*Reiter RJ et al., 2000; Reiter RJ, 2002; Sener G et al., 2002*). Освен това мелатонинът, обезвреждайки ROS/RNS, инхибира клетъчната инфилтрация, синтеза на провъзпалителни цитокини и остро фазови протеини, което също допринася за ограничаване на индуцираното от изгаряне тъканно увреждане, включително и на стомашната лигавица (*Reiter RJ et al., 2000; Reiter RJ, 2002*). Гастропротективният ефект на мелатонина е наблюдаван и при други еспериментални модели на мукозно увреждане (*Sener-Muratoglu G et al., 2001; Cabeza J et al., 2001*).

Смята се, че плазменият антиоксидантен статус се дължи на ниско-молекулните антиоксиданти в частност на SH-групите на протеините, (албумините), алфа-токоферол аскорбат и билирубин. Нашите резултати показват спад в нивото на тоталните тиоли, което вероятно е за сметка на албумините, основен тиолов антиоксидант в плазмата и основен резервоар на плазменият протеинов SH-пул. Плазмените SH-групи, включително серумният албумин, най-вероятно са били „използвани“ от плазмената антиоксидантна система. Плазмената концентрация на албумин значително намалява след термично увреждане на кожата (*Bekyarova G et al., 2012; Bekyarova G et al., 1997*).

Получените от нас резултати показват, че нивото на ПК в плазмата показва тенденция към понижаване. Установена е връзка между повишени плазмени нива на ПК и степента на тъканно увреждане на кожата в ранната фаза след ТТ при клинични изследвания (*Yamazaki T et al., 2003; Subrahmanyam M et al., 2003*). Според нас плазменото ниво на ПК не е определящо за плазмения антиоксидантен статус при ТТ. Считаме, че то не отразява оксидативните промени в стомашната лигавица. Следователно други компоненти на антиоксидантния статус като витамини

Е, А и С, церулоплазмин и билирубин, които са понижени при ТТ, могат да са причина за намалената плазмена антиоксидантна защита (*Haussock JW et al., 1997*). Ние и други автори установихме, че плазменото ниво на MDA се увеличава, но в по-малка степен, отколкото в стомашната лигавица (*Pintaudi AM et al., 2000*). Мелатонинът намалява повишените нива на този липиден пероксид, което показва, че той основно ограничава тъканното увреждане в острата фаза след ТТ.

В заключение от направените изследвания и анализи следва извода, че изследваните маркери на оксидативният стрес в таргетната тъкан - стомашна лигавица, отразяват по-адекватно активността на свободнорадикалните процеси и антиоксидантния капацитет, отколкото в плазмата, което би трябвало да се има предвид при бъдещи клинични проучвания.

В настоящото проучване се установи повишена експресия на двата антиоксидантни ензима HO-1, Cu/Zn SOD на фона на засилената липидна пероксидация в клетките на стомашната мукоза след ТТ. Може да се предположи, че повишената експресия на тези ензими вероятно е свързана с повишеното генериране на свободни радикали в стомашната лигавица след ТТ. Мелатонинът допълнително повишава експресията на HO-1 и Cu/Zn SOD и намалява нивото на продуктите на липидната пероксидация. Освен това мелатонинът повишава синтеза на глутатион, както и на други антиоксидантни ензими от глутатионовата система (*Sener G et al., 2006*).

В заключение, мелатонинът повишава експресията на Cu/Zn SOD и HO-1 и действа като естествен индуктор на антиоксидантната защита в стомашната лигавица. Повишаването на антиоксидантния капацитет на клетките е нов механизъм за протекция срещу индуцираното от ТТ увреждане на стомашната лигавица.

2. Про- и антивъзпалителни медиатори и ролята на мелатонина като модулатор на възпалителния отговор при термична травма

Термичната травма предизвиква локално увреждане на тъканите. Активиратите провъзпалителни клетки (неутрофили, макрофаги) синтезират и освобождават големи количества хемокини, цитокини, адхезионни молекули, алармини), които попадайки в кръвообръщението, могат да предизвикат системен възпалителен отговор (*Bianchi ME et al., 2007*). Повишената продукция на провъзпалителни цитокини, липидни пероксиди, острофазови протеини и активирането на полиморфонуклеарни клетки играят важна роля в индуцираният от ТТ системен възпалителен отговор (*Friedl HP et al., 1989; Rawlingson A et al., 2003*). Резултатите от настоящото изследване показват повишени плазмени нива на провъзпалителния цитокин TNF- α след ТТ, което е доказателство за ролята на този медиатор в ранния локален и системен възпалителен отговор.

TNF- α не е само медиатор, инициращ възпалението, но играе важна роля в неговото протичане (*Ravat F et al., 2011; Schwacha MG et al., 2001; Noel G et al., 2007*). Той индуцира експресията и на други възпалителни медиатори - IL-1 α , β , IL-6 и IL-8, оформящи цитокинова мрежа, адхезионни молекули, острофазови протеини (*Castell JV et al., 1989; Turner NA et al., 2007*) и на противовъзпалителния цитокин IL-10 (*Standiford TJ et al., 1995*). TNF- α повишава продукцията на ROS от провъзпалителните клетки при намалена антиоксидантна защита в стомашната лигавица. ROS активират липидната пероксидация и предизвикват увреждане на клетъчните мембрани при ТТ (*Işeri SO et al., 2008; Sehirli O et al., 2008*). TNF- α , както и ROS, повишават експресията на транскрипционния фактор NF- κ B, отговорен за продукцията на други провъзпалителни медиатори с цито-

токсично действие. Съществува корелационна зависимост между MDA и TNF- α в черния дроб при изгаряне (Бежарова Г, 2014) и между плазменото ниво на TNF- α и степента на термичното увреждане (Agay D et al., 2008). TNF- α играе ключова роля в патогенезата на увреждане на стомашната лигавица (Işeri SO et al., 2008) и други органи (черен дроб, слезка, бели дробове, сърце) при термична травма (Beжарова G et al., 2012; Wu JZ et al., 1995; Chen XL et al. 2003; Maass DL et al., 2002). Аналогични на нашите данни са получени при клинични и експериментални проучвания при ТТ (Onuoha GN et al., 2000; Kim HS, et al., 2012; Finnerty CC et al., 2009). Като цяло данните за промените на TNF- α нивата в тъкани и плазма са противоречиви. Някои автори не установяват промени при животни с термична травма в сравнение с тези без увреждане, което най-вероятно се дължи на експерименталния дизайн и продължителността на изследвания период (Gauglitz GG et al., 2008). Цитотоксичният ефект на TNF- α е доказан и при действието на други, увреждащи стомашната лигавица фактори като стрес (Hamaguchi M et al., 2001), НСПВС (MHLР Souza H et al., 2004) и етанол (Hany HA et al., 2015).

TNF- α , активирайки „death“- апоптотичния сигнален път, предизвиква апоптоза на ендотелните клетки и повишава ендотелния пермеабилитет (Stagg HW et al., 2013). TNF- α потиска активирането на eNOS, инхибира неговото антикоагулантно и противовъзпалително действие; индуцира експресията на тъканния фактор (TF) - по този начин стимулира локалните провъзпалителни и прокоагулантни процеси (Beжарова G et al., 2010; Okajima K, 2000). TNF- α увеличава продукцията не само на провъзпалителните цитокини, но и на някои провъзпалителни ензими като iNOS (Merial-Kieny C et al., 2003; Szabó C, 1995). Нашите данни показват повишена експресия на ензима в епителните клетки на стомашната лигавица при ТТ. Аналогични са промените в активността на iNOS установени при

различни модели на увреждане на стомашната лигавица в условията на оксидативен стрес, индуциран от аспирин (*Wang Z et al., 2011*), И/Р (*Yi L et al., 2012*) и стрес при потапяне във вода (*Ma N et al., 2009*).

Повишената продукция на NO от iNOS и на $O_2^{\cdot-}$ стимулира образуването на ONOO $^{\cdot}$, притежаващ токсичен ефект върху тъкани, включително и на стомашната лигавица (*Pacher P et al., 2007*). Пероксинитритът атакува DNA, мембранните липиди и протеини. Той повишава липидната пероксидация и предизвиква оксидативно увреждане на стомашната лигавица, доказано чрез повишените нива на MDA и 4-HNE. Пероксинитритът инактивира тиоловите антиоксиданти, Mn SOD, COX, eNOS и продукцията на други гастрозащитни фактори (простагландини, NO) (*Szabó C & Módis K, 2010*). Особено токсично е неговото действие върху митохондриите – предизвиква митохондриална дисфункция и клетъчна смърт (апоптоза и некроза) (*Guzik TJ et al., 2003*).

Резултатите от настоящото изследване показват, че нивото на провъзпалителните медиатори се увеличава значително, докато нивото на IL-10, притежаващ антивъзпалително действие, не се променя. Данните за нивата на IL-10 при термична травма са противоречиви. Аналогични са резултатите получени от едни автори (*Kawakami M et al., 1997*), други установяват, че нивата на антивъзпалителните цитокини IL-2 и IL-10 са повишени, с пик в по-ранните часове след ТТ (*Jeschke MG et al., 2002*). Основна роля на IL-10 е да потиска продукцията на провъзпалителни медиатори и да участва в регулирането на възпалителния отговор (*Ward NS et al., 2008; Asadullah K et al., 2003*). Възможно е IL-10 да осъществява ефектите си чрез инхибиране на нуклеарния фактор NF-kB (*Schottelius AJ et al., 1999*) и по независещи от NF-kB пътища (активиране на Nrf2 и HO-1) (*Lee IT et al., 2009*).

Получените от нас резултати показват, че дисбалансът между провъз-

палителни и антивъзпалителни цитокини в условия на оксидативен стрес е един от основните механизми за увреждане на стомашната лигавица. В подкрепа на това твърдение са резултатите от патохистологичните изследвания в стомашната лигавица при ТТ. Предполага се, че дисбалансът между TNF- α и IL-10 е един от инициращите фактори за развитие на синдром на системен възпалителен отговор и полиорганна недостатъчност в началния период след изгаряне (*Jaffer U et al., 2010*). За изясняване на тези промени в различните етапи на тежката термична травма са необходими по-нататъшни и задълбочени проучвания. Изследването на баланса между про-и антивъзпалителни цитокини се използва като прогностичен маркер в клиничната практика (*Taniguchi T et al., 1999*). Данните от литературата показват, че прилагането на антиоксиданти инхибира възпалителните промени, ограничава увреждането на стомашната лигавица и други органи (*Konturek PC et al., 2006*) и подобрява тяхната функционална активност (*Bandyopadhyay D et al., 2000*).

Данните от настоящото проучване показват, че мелатонинът понижава плазменото ниво на TNF- α и повишава нивото на антивъзпалителния цитокин IL-10. И други автори, установяват, че противовъзпалителното действие на мелатонина е свързано с намаляване плазменото ниво на TNF- α и повишаване нивото на IL-10 (*Carrillo-Vico A et al., 2005; Ochoa JJ et al., 2011*). Най-вероятно това се дължи на инхибиращото действие на мелатонина върху NF-kB (*Sasaki M et al., 2002*) доказано и при ТТ (*Bekyarova G et al., 2012*). Ние предполагаме, че мелатонинът и IL-10 имат синергично действие в протекцията на стомашната лигавица в ранната фаза след ТТ. Следователно мелатонинът подобрява про- /антивъзпалителният цитокинов баланс и ограничава увреждането на стомашната лигавица от ексцесивно възпаление. Това вероятно е един от основните протективни ефекти на мелатонина в стомашната лигавица.

Прилагането на мелатонин намалява също експресията на iNOS в стомашната лигавица, но тя не достига изходните нива. Предполага се, че намалената iNOS активност е свързана с потискане експресията на NF- κ B (Kireev RA et al., 2012; Shi D et al., 2012). По този начин мелатонинът ограничава токсичното действие на NO/iNOS в условията на повишено генериране на свободни радикали в стомашната лигавица до синтезиране на субтоксични нива NO. Известно е, че NO е важен протектор на стомашната лигавица като ендогенен вазодилатор, подобряващ нейния кръвоток (de Souza GF et al., 2015; Sobhian B et al., 2011). Освен това той стимулира продукцията и на други гастропротективни фактори - синтеза на простагландини (Uno H et al., 1997), секрецията на мукус (Brown JF et al., 1993; Kim H et al., 2001) и бикарбонати в стомаха (Aihara et al., 2006). Мелатонинът повишава експресията на eNOS и подобрявайки ендотелната и микроциркулаторна дисфункция, ограничава тъканните увреждания при термична травма (Бежарова Г, 2015). Предполагаме, че намалената от мелатонина свърхпродукция на NO, медирана от iNOS, има защитен ефект върху стомашната лигавица при изгаряне. Доказателство за това е липсата на морфологични промени в стомашната лигавица след прилагане на мелатонин.

В заключение мелатонинът променя дисбаланса между про- и антивъзпалителни медиатори в полза на антивъзпалителните медиатори и ограничава тъканното увреждане, индуцирано след термичната травма. Следователно мелатонинът, модулирайки възпалителният отговор, протектира стомашната лигавица от увреждащото действие на провъзпалителните медиатори и други увреждащи фактори. Тези резултати потвърждават широкия терапевтичен потенциал на мелатонина и дават основание за възможното му прилагане при лечение на критични състояния на организма.

3. Про- и антиапоптотични протеини и патоморфологични промени в стомашната лигавица и ефект на мелатонина при термична травма

Известно, че при термична травма в стомаха се образуват стресови язви (*Pruitt BA Jr & Goodwin CW Jr, 1981; Markell KW et al., 2009*). Получените от нас резултати потвърждават данните от литературата за поява на стомашни ерозии при ТТ. Ние установихме, че на 24-ия час ерозивният индекс е 150 единици. Подобни промени са наблюдавани и при други експериментални модели на увреждане като И/Р на стомашната лигавица (*Brzozowski T et al., 2006*). Лигавичните увреждания са значително редуцирани след прилагането на мелатонин в доза 2×10 mg/kg тегло.

Дълго време се е приемало, че увреждането на стомашната лигавица е резултат от плазмозагуба с последваща исхемия и некроза. При хистологичното изследване ние установихме циркулаторни нарушения, включващи съдова конгестия и кръвоизливи, възпалителен инфилтрат, представен от неутрофилни левкоцити, деструкция на покривния епител и увреждане на жлезния слой до степен на формиране на остри ерозии. Точните патогенетични механизми на поява на остри лигавични лезии в стомашната мукоза при ТТ все още не са напълно изяснени. В литературата се обсъждат редица фактори на увреждане като хипоперфузия, И/Р, повишена продукция на провъзпалителни цитокини, ROS и липидна пероксидация. Липсва достатъчно информация относно ролята на оксидативният стрес, индуциран от ТТ, в клетките на стомашната лигавица и в други органи.

Получените от нас резултати показват, че тоталните тиоли в стомашната лигавица са намалени. Имунохистохимичното изследване на стомашната мукоза показва липсата на статистически значими промени в активността на Cu/Zn SOD, антиоксидантен ензим, който обезврежда $O_2^{\cdot-}$. От

друга страна ние установихме повишаване активността на iNOS при ТТ. Известно е, че високите нива на NO/iNOS и $O_2^{\cdot-}$ водят до образуване на токсичния $OONO^{\cdot-}$, който уврежда лигавиците, включително стомашната и нарушава бариерната им функция при ТТ (*Chen LW et al., 2004*). Според нас стомашните лезии са свързани с намаления антиоксидантен капацитет на стомашната мукоза на фона на повишеното генериране на свободни радикали.

Запазването на тъканната хомеостаза в органите, включително и в стомаха, зависи от баланса между клетъчна пролиферация и клетъчна смърт. Загубата на клетки т.е. клетъчната смърт настъпва главно по два пътя, по пътя на апоптоза и/или некроза. Всяка промяна в баланса между апоптоза и клетъчна пролиферация нарушава тъканната хомеостаза и води до промяна в тъканния интегритет и органната функция (*Yamaguchi T et al., 2000*).

В това изследване се акцентира върху апоптозата като механизъм на увреда в стомашната лигавица при ТТ както и върху ефекта на мелатонина върху апоптозата. Резултатите от настоящото проучване показват, че експресията на Вах протеина е повишена предимно в горните отдели на стомашната лигавица, където най-често са локализирани лигавичните лезии при ТТ. Получените от нас резултати са в съответствие с данните и на други автори, които намират, че Вах протеинът е повишен в хепатоцити, кардиомиоцити и интестинални клетки при експериментална ТТ (*Jeschke MG et al., 2007; Bekyarova et al., 2013*). Вах протеинът е основният проапоптотичен протеин, който може да активира апоптозата по няколко възможни механизма. В ранната фаза на ТТ тъканната перфузия е редуцирана, продукцията на свободни радикали и провъзпалителни цитокини от активираните левкоцити е повишена. Свръхпроизводството на ROS, генерирани от митохондриите (*Finkel T., 2011; Murphy MP, 2009*) и от други прооксидантни пътища в условия на исхемия/реперфузия (*Sasaki*

M & Joh T, 2007) уврежда антиоксидантната защита и води до генериране на силно токсични липидни пероксиди (*Chen Y & Junger WG, 2012; Sehirli O et al., 2008*). Получените от нас резултати показват, че липидните пероксидни продукти като MDA и 4-HNE са повишени, което е в съответствие с данните и на други автори (*Ayala A et al., 2014*).

Митохондриите са свръхчувствителни към увреждащото действие на липидните пероксиди, като 4-HNE, който оксидира сулфхидрилните групи на глутатиона и активира клетъчна смърт. Отдавна е известно, че митохондриалният оксидативен стрес е от първостепенно значение за тъканната алтерация, в това число и на стомашната лигавица. 4-HNE стимулира транслокацията на Вах протеини от цитозола към митохондриите, повишава пермеабилитета на митохондриалната мембрана, води до освобождаване на цитохром С в цитоплазмата, активира каспазите и предизвиква програмирана клетъчна смърт (*Elmore S, 2007*).

Програмираната клетъчна смърт може да бъде асоциирана и с недостатъчна експресия на Bcl-2, който е основният антиапоптотичен протеин, действащ чрез инхибиране действието на Вах протеина. Ние установихме, че в стомашната лигавица при ТТ има понижена експресия на Bcl-2 протеина в сравнение с контролната група плъхове. Получените от нас резултати съответстват на промените, наблюдавани и от други автори, които установяват намалена експресия на Bcl-2 протеина при експериментална ТТ (*Jeschke MG et al., 2007; Bekyarova G et al., 2013*).

Освен от понижената експресия на Bcl-2 протеина, поведението на клетките при увреждане зависи от баланса между протеините Вах и Bcl-2 като този баланс определя дали ще настъпи апоптоза или клетката ще оцелее (*Korsmeyer SJ et al., 1993*). Дисбаланс между про- и антиапоптотичните протеини, медиращ апоптоза, е установен при различни модели на стомашно увреждане, индуцирано от НСПС, стрес и други (*Maity P et al.,*

2009). Получените от нас резултати показват, че алтерацията на стомашната лигавица е свързана с апоптоза, която се дължи на повишена експресия на Вах протеина и на съотношението Вах/Bcl-2, които са по-високи в групата с ТТ в сравнение с контролната група.

Апоптозата в епителните клетки може да бъде активирана освен чрез повишена експресия на Вах протеин и висок индекс Вах/Bcl-2 и чрез външните death-рецептори. Основна роля в индукцията на този сигнален път играят Fas и TNF- α , които се свързват съответно с Fas-рецептора и TNF-R1 и се индуцира Fas-associated death domain (FADD), който от своя страна активира каспаза-8 и ефекторната каспаза-3. Активирана каспаза-3 разцепва Bid (Bcl-2 homology domain 3 (BH3) interacting domain death agonist) на t-Bid (truncate Bid), което предизвиква освобождаване на митохондриалния цитохром С, с което се активира каспаза-9 и в следствие настъпва активиране и на каспаза-3. Bid е един от основните ключовите компоненти на вътреклетъчната молекулна сигнализация от Fas-индуцирана към митохондриална апоптоза (Liou CM et al., 2014). Ние установихме повишено плазмено ниво на TNF- α при ТТ. Предполагаме, че при ТТ апоптозата може да бъде активирана чрез външните death-рецептори посредством TNF- α , клетъчно сигнален протеин, участващ в системното възпаление и острата фазова реакция (Turner NA et al., 2007; Castell JV et al., 1989). Повишената апоптоза в хепатоцитите при експериментална термична травма се свързва с повишеното ниво на TNF- α и NF- κ B – медирана апоптоза (Bekyarova G et al., 2013). Данните от литературата показват, че TNF- α индуцира апоптоза на ентерохромафинните клетки на стомашната лигавица чрез активиране на NF- κ B и повишено образуване на NO (Huber C et al., 2002). Апоптозата може да бъде индуцирана и чрез сигнален път iNOS/Bax/caspase 3, докато инхибирането на продукцията на NO/iNOS модулира проапоптотичните маркери Вах, цитохром С и кас-

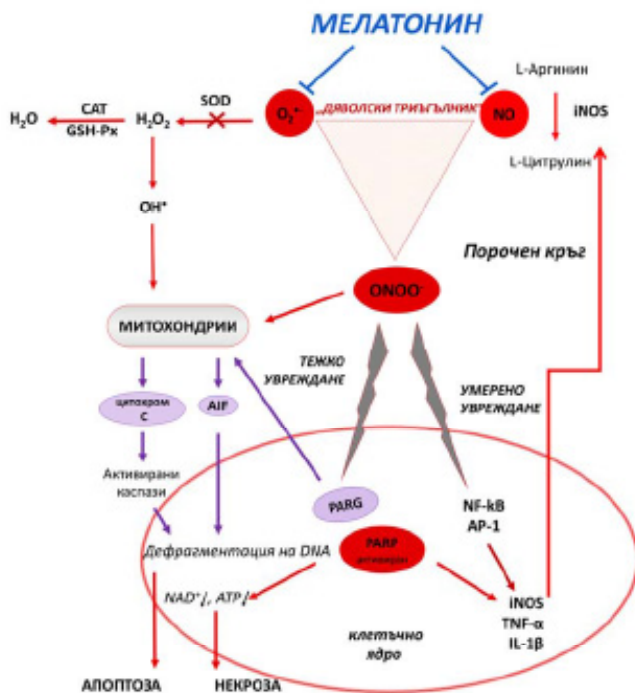
паза 3 и намалява апоптозата (*Anand T et al., 2014*). Имунохистохимично ние установихме повишена експресия на iNOS в цитоплазмата на епителните клетки предимно в горната половина на стомашната лигавица при ТТ, където деструктивните промени са най-изразени.

Повишен апоптотичен потенциал може да бъде индуциран и от циркулиращи ендотоксини, освободени в резултат на нарушена чревно-тъканна бариера след ТТ. Carlson et al. съобщават, че повишените нива на каспаза-3, увеличената апоптоза на кардиомиоцитите и сърдечната дисфункция след изгаряне възникват в резултат на ендотоксин-зависим механизъм (*Carlson DL et al., 2002*).

Ние установихме повишаване на нивото на ПК в стомашния хомогенат в групата с ТТ. Повишената продукция на ПК в тъканите се счита за маркер за тъканна некроза (*Kono H et al., 2010*). Нашите данни показват повишена продукция на ON от активираната iNOS. Повишената продукцията на ONOO⁻ при активиране на iNOS в условията на оксидативен стрес също индуцира клетъчна смърт (апоптоза и некроза). Според Korkmaz A et al. повишената продукция на ONOO⁻ се свързва по-скоро с некроза, отколкото с апоптоза, особено при дефицит на тиоловия антиоксидант глутатион (Фигура 28) (*Korkmaz A et al., 2009*). Получените от нас резултати показват, че тъканната алтерация на стомашната мукоза вероятно е свързана и с некроза на епителните клетки. Следователно деструктивните промени на стомашната лигавица при ТТ може би са свързани с двата основни типа на клетъчна смърт: апоптоза и некроза.

След прилагане на мелатонин се наблюдава редуциране на лигавичните лезии при ТТ, ерозивният индекс е намален до 28 единици и интегритета на стомашната лигавица е възстановен почти напълно. При микроскопското изследване не се откриват съдова конгестия, възпалителна инфилтрация и явни некротични промени. Процентът на защита на стомашната

лигавица от мелатонина е 81.



Фигура 28 – Термичната травма стимулира образуването на $O_2^{\bullet-}$, които нормално се обезвреждат от антиоксидантния ензим SOD. При повишена продукция на NO/iNOS и неадекватна антиоксидантна защита в условията на оксидативен стрес се образува токсичния ONOO⁻ („дяволски триъгълник“). ONOO⁻ уврежда DNA и активира ензима поли ядрена (ADP-рибоза) полимераза (PARP-1), който понижава нивото на ATP, изчерпва NAD⁺ и предизвиква клетъчна смърт (апоптоза и некроза). Мелатонинът, повишавайки активността на SOD и потискайки експресията на iNOS, блокира „дяволския триъгълник“ и токсичното действие на ONOO⁻. Адаптирана по Korkmaz A et al., 2009 и Pacher P & Szabo C, 2008.

Точните механизми на гастропротективното действие на мелатонина са обект на дискусия. Благоприятният ефект на мелатонина се свързва с понижена експресия на Вах протеина и/или повишена експресия на Bcl-2 протеина (Maity P et al., 2009), който действа чрез активиране на NF-kB

(Cristofanon S et al., 2009). При нашия модел експресията на Bcl-2 протеина е повишена след прилагане на мелатонин в сравнение с групата с ТТ. Подобно повишение се установи и за проапоптотичния Вах протеин. Според нас протективното действие на мелатонина е свързано с повишената експресия на Bcl-2 протеина, независимо от повишената експресия на проапоптотичния Вах протеин. Мелатонинът намалява индекса Вах/Bcl-2, но стойностите остават сравнително високи в сравнение с контролната група. Резултатите, получени от нас показват, че индексът Вах/Bcl-2 по-точно отразява състоянието на апоптоза или оцеляване на стомашните епителни клетки, отколкото само повишението на Bcl-2 протеина при ТТ. Данните от литературата показват, че индексът Вах/Bcl-2 и апоптозата на клетките в стомашната лигавица намаляват след прилагането на мелатонин и при други модели на увреждане, индуцирано от индометацин, И/Р, стрес, етанол (Maity P et al., 2008; Jiang M et al., 2015). Това вероятно е асоциирано със способността на мелатонина да ре-локализира Bcl-2 в митохондриите, в резултат на което активирането на Вах на митохондриално ниво се неутрализира (Radogna F et al., 2008).

Получените от нас резултати показват, че прилагането на мелатонин понижава експресията на 4-HNE в стомашната лигавица при ТТ. Известно е, че мелатонинът като антиоксидант действа по директен и индиректен механизъм като редуцира нивото на 4-HNE и ограничава митохондриалната дисфункция. Той повишава синтеза на глутатиона, а поддържането на глутатионовата хомеостаза е от важно значение за инхибиране на оксидативния стрес и за протективно действие на глутатиона върху митохондриите и другите субклетъчни структури (Antolín I et al., 1996; León J et al., 2005; León J et al., 2005). Мелатонинът може да взаимодейства с липидния бислой и да стабилизира вътрешната митохондриална мембрана; да инхибира пропускливостта на митохондриалните пори, освобождаването на

Ca²⁺ и цитохром С (*Andrabi SA et al., 2004*). В допълнение той подобрява енергопродукцията в митохондриите, ограничава клетъчното увреждане и дори клетъчната смърт (*León J et al., 2005; Martín M et al., 2000*).

Доказано е, че мелатонинът понижава мембранното цитотоксично действие на TNF- α (*Espino J et al., 2013*), свръхпродукцията на NO/iNOS/ONOO⁻ и намалява увреждащото действие върху митохондриите (*Acuña Castroviejo et al., 2002*). Редуцираното плазмено ниво на TNF- α , което е установено от нас означава, че мелатонинът, приложен при ТТ, може да блокира проапоптотичната сигнална каскада. От друга страна потискането на апоптозата вероятно е свързано и с редуциране на iNOS експресията, която е понижена при прилагане на мелатонина.

Гастропротективният ефект на мелатонина, както показва настоящото проучване, е свързан с предотвратяване на некрозата, а не само на апоптозата. Ние установихме, че прилагането на мелатонин при ТТ намалява съдържанието на пикочната киселина в стомашен хомогенат.

Съществуват убедителни данни, че апоптозата персистира дълго време след ТТ и трудно се повлиява от прилагането на терапевтични средства (черен дроб и черва). Пролиферативните промени в мукозата на червата настъпват много по-късно в сравнение с черния дроб след ТТ (*Jeschke MG et al., 2001; Jeschke MG et al., 2001a; Jeschke MG et al., 2007*).

В заключение, индуцираното от термичната травма увреждане на стомашната лигавица води до тежки деструктивни промени, които нарушават тъканния интегритет и увеличават ерозивния индекс на стомаха. Оксидативният стрес е един от важните механизми за увреждане на стомаха. Гастропротекторното действие на мелатонина се свързва с ограничаване на липидната пероксидация, акумулирането на 4-HNE, потискане експресията на TNF- α , iNOS, понижаване концентрацията на пикочна киселина и модулиране съотношението на проапоптотични и антиапоптотични протеини.

Проучването на патофизиологичните механизми на стресовите язви при изгаряне ще хвърли нова светлина в прилагането на потенциални профилактични или терапевтични подходи за контрол на това усложнение.

4. Експресия на транскрипционния фактор Nrf2 и ролята му за повишаване на антиоксидантния капацитет, потискане на възпалението, апоптозата и увреждането на стомашната лигавица при термична травма и ефект на мелатонина

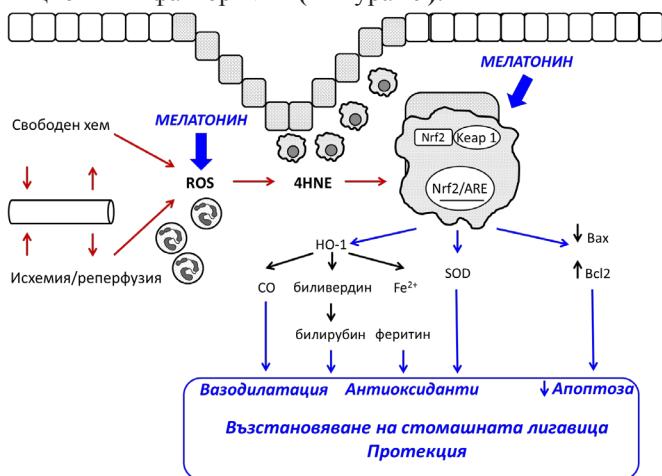
Известно е, че мелатонинът повишава антиоксидантния капацитет в стомашната лигавица, осигурявайки протекция срещу оксидативният стрес, един от основните механизми за нейното увреждане. Регулирането на тези механизми е важно, за да се предотврати цитотоксичното действие на свободните радикали. Ограничена е наличната информация за ефекта на мелатонина върху редокс-сензитивния транскрипционен фактор Nrf2 като регулатор на антиоксидантните ензими, антиоксиданти и на антиоксидантната защита на стомашната лигавица.

Резултатите от настоящото проучване показват слабо повишена експресия на Nrf2, основно в цитоплазмата на епителните клетки на стомашната лигавица при животните с ТТ спрямо контролите. Паралелно с това се повишава експресията и на антиоксидантните ензими Cu/Zn SOD и HO-1 на фона на активираните оксидативни процеси. Приложеният мелатонин повишава още повече експресията на транскрипционния фактор Nrf2 и на антиоксидантните ензими Cu/Zn SOD и HO-1 в стомашната лигавица, които са мукозална бариера срещу оксидативно увреждане, индуцирано от ТТ.

Nrf2 е ключов фактор за антиоксидантната защита и запазването на кле-

тъчната хомеостаза. Той е локализиран в цитоплазмата в неактивно състояние, свързан с Keap1 репресорен протеин. Оксидативната модификация на Keap1 индуцира ядрената транслокация на Nrf2 и повишава експресията на гени на антиоксидантни ензими като HO-1, GGL, GST, SOD, участващи в антиоксидантната защита (Ma Q, 2013; Kobayashi A et al., 2004). Активирането на Nrf2 повишава клетъчната резистентност към вредни въздействия и при нормална клетъчна дейност (Lee JM et al., 2005).

Вероятният механизъм, чрез който мелатонинът повишава експресията на Nrf2 е свързан с дисоциацията на Nrf2/Keap1 и транслокацията на Nrf2 в клетъчното ядро. Там той се свързва с ARE в промотора на гените на антиоксидантните ензими. Освен това мелатонинът намалява ROS/RNS и нивата на липидните пероксиди. В резултат на това пониженият до субтоксично ниво 4-HNE действа като сигнална молекула, модифицира цистеиновите тиоли на Keap1, предизвиква фосфорилация и активира транскрипционният фактор Nrf2 (Фигура 29).



Фигура 29. Схематично представяне на ролята на мелатонина при активиране на 4-HNE/Nrf2/ARE сигнален път и протектиране на стомашната лигавица от остро увреждане, индуцирано при термична травма. Адаптирана по Ueda K et al., 2008.

Нормално ензимът HO-1 слабо се експресира в стомашната лигавица. Активирането на този стрес ензим се свързва с оксидативния стрес (повишеното генериране на свободни радикали) в стомашната лигавица в условията на И/Р и системно възпаление в острия период след ТТ. Въпреки, че няма директни антиоксиданти свойства, HO-1 и неговите продукти CO, билирубин и феритин имат цитопротекторни свойства срещу оксидативния стрес (*Deshane J et al., 2005*). Съществуват доказателства, че HO-1 участва в защитата срещу възпаление и оксидативен стрес в различни патологични състояния (*Farombi EO et al., 2006; Constantin M et al., 2012; Cuadrado A et al., 2008*). HO-1 и неговите продукти намаляват експресията на транскрипционния фактор NF-kB и синтеза на провъзпалителни цитокини (TNF- α , IL-1, IL-6), както и активността на провъзпалителния ензим iNOS и свръхпродукцията на NO. По този начин HO-1 потиска един от основните пътища за генериране на ROS/RNS и оксидативното увреждане на стомашната мукоза (*Dulak J & Jozkowicz A, 2014*).

Нашите данни показват, че мелатонинът повишава активността на HO-1 и паралелно потиска експресията на iNOS, като и нивото на TNF- α . Вероятно това е един от възможните механизми, чрез който мелатонинът протектира срещу образуването на лезии в стомашната лигавица при ТТ. Следователно цитопротекторното и противовъзпалително действие на мелатонина се свързват с повишената експресия на HO-1 в стомашната лигавица.

Съществуват доказателства за това, че HO-1 потиска както митохондриалния така и death-рецепторен/Fas апоптотични пътища (*Nakao A et al., 2003; Kim SJ et al., 2013*). Известно е, че CO стимулира експресията на антиапоптотичния Bcl-2 протеин и потиска експресията на проапоптотичния Bax протеин (*Nakao A et al., 2003*). Антиапоптотичното действие на CO се реализира чрез участие в p38 MAPK сигнален път (*Brouard S et al, 2000*).

Мелатонинът, повишавайки експресията на ензимите HO-1 и Cu/Zn SOD, увеличава антиоксидантния потенциал на клетките, потиска възпалителния отговор, апоптозата и тъканното увреждане на стомашната лигавица при термично увреждане. Това ни дава основание да считаме, че активирането на HO-1 и Cu/Zn SOD е нов механизъм за гастропротекция от мелатонин при ГТ.

Активирането на транскрипционният фактор Nrf2 повишава експресията на ензими, участващи в глутатионовия синтез, като скоростоопределящия ензим γ -глутамил цистеин лигаза (GCL) и възстановяващ редокс-състоянието на клетката, както и ензима GST, неутрализиращ 4-HNE (*Steele ML et al., 2013; Mani M et al., 2013*).

Протективният ефект на Nrf2/HO-1 в стомашната лигавица е демонстриран при други експериментални модели на увреждане на стомаха – остри стресови лезии (*Ueda K et al., 2008*), *Helicobacter pylori* (*Yanaka A, 2011*), индометацин (*Lee HJ et al., 2012*). Мелатонинът, активирайки Nrf2, проявява гастропротекторен ефект и при други експериментални модели на чернодробна И/Р, фулминантна чернодробна недостатъчност и при действието на хепатотоксини (*Kang JW & Lee SM, 2012; Crespo I et al., 2010; Jung KH et al., 2009*).

За първи път гатропротивният ефект на мелатонина се свързва с активиране на Nrf2/ARE сигналния път при термичната травма. Резултатите от настоящото проучване показват, че мелатонинът, активирайки Nrf2/ARE сигнален път, повишава експресията на Cu/Zn SOD и HO-1 и действа като естествен индуктор на антиоксидантната защита в стомашната лигавица. Стимулирането на антиоксидантните механизми на клетките от мелатонина е нов механизъм за протекция срещу индуцираното от термична травма увреждане на стомашната лигавица.

ИЗВОДИ

1. Термичната травма индуцира оксидативно увреждане на стомашната лигавица като увеличава липидната пероксидация и нивата на липидните продукти (MDA, 4-HNE) и стимулира антиоксидантната защита като увеличава експресията на Cu/Zn SOD и HO-1.
2. Термичната травма увеличава оксидативните процеси в плазмата като повишава нивата на UA и намалява нивата на общите SH.
3. Мелатонинът инхибира оксидативното увреждане на стомашната лигавица като подтиска оксидативните процеси и подобрява антиоксидантната защита като:
 - Понижава нивата на MDA, UA и 4-HNE;
 - Повишава нивата на общите SH;
 - Допълнително увеличава експресията на Cu/Zn SOD и HO-1.
4. Мелатонинът не оказва ефект върху оксидативните процеси в плазмата.
5. Термичната травма индуцира системен възпалителен отговор като увеличава плазмените нива на провъзпалителния цитокин TNF- α , нарушава баланса между провъзпалителни и антивъзпалителни цитокини в плазмата и увеличава експресията на iNOS в стомашната лигавица.
6. Мелатонинът модулира възпалителния отговор като :
 - Понижава нивата на провъзпалителния цитокин TNF- α и увеличава нивата на антивъзпалителния цитокин IL-10;
 - Променя дисбаланса между провъзпалителни и антивъзпалителни цитокини в полза на антивъзпалителния цитокин IL-10;
 - Понижава експресията на провъзпалителния ензим iNOS в стомашната лигавица.

7. Термичната травма индуцира клетъчна смърт чрез апоптоза в стомашната лигавица като:
 - Повишава експресията на проапоптотичния протеин Вах;
 - Понижава експресията на антиапоптотичния протеин Всl-2;
 - Увеличава съотношението между проапоптотичния и антиапоптотичния протеини Вах/Всl-2.
8. Мелатонинът ограничава индуцираното от термичната травма увреждане на стомашната лигавица като модулира експресията на апоптотичните протеини от Всl-2-семейството и понижава съотношението Вах/Всl-2.
9. Мелатонинът повишава експресията на Nrf2, активира Nrf2/ARE сигнален път, повишава експресията на Cu/Zn SOD, HO-1 и антиоксидантната защита и ограничава увреждането на стомашната лигавица, индуцирано от термичната травма.
10. Термичната травма предизвиква значително тъканно увреждане на стомашната лигавица проявено:
 - Макроскопски с изразена хиперемия, повърхностни разязвявания на лигавичните гънки и увеличен ерозивен индекс;
 - Микроскопски със съдова конгестия, дегенеративни промени, загуба на покривния епител, огнищна деструкция на жлезистия епител.
11. Мелатонинът възстановява:
 - Макроскопските поражения на стомашната лигавица до наличие на отделни участъци с хиперемия, значително понижава ерозивния индекс и проявява терапевтичен ефект в над 80% от случаите;
 - Микроскопската структура на стомашната лигавица.

ПРИНОСИ

С оригинален характер

1. Извършен е системен анализ на влиянието на мелатонина върху увреждането на стомашната лигавица при термична травма.
2. За пръв път е изследвана комплексната роля на 4-HNE, iNOS, Cu/Zn SOD, HO-1, Вах, Bcl-2 и Nrf2 в стомашната лигавица при термична травма.
3. За пръв път е проучен ефекта на мелатонина върху експресията на 4-HNE, антиоксидантните ензими Cu/Zn SOD и HO-1, апоптоичните протеини Вах и Bcl-2 и транскрипционния фактор Nrf2 в стомашната лигавица при термична травма.
4. За първи път е доказано, че активирането на Nrf2/ARE сигнален път от мелатонина повишава защитата на стомашната лигавица при термична травма.
5. За първи път е доказано, че гастропротективния ефект на мелатонина при термична травма е свързан с повишаване активността на ензима HO-1, притежаващ антиоксидантно, антивъзпалително и антиапоптоично действие.
6. За първи път се доказва участието на апоптозата като механизъм за тъканно увреждане на стомашната лигавица при термична травма.
7. Получените данни разширяват знанията и възможността за прилагане на мелатонина като алтернативно средство за лечение на остри лезии на стомаха, индуцирани от термична травма и други стресови състояния на организма.

С потвърдителен характер

1. Потвърдени са експерименталните и клинични данни за остро увреждане на стомашната лигавица в ранните етапи на термичната травма.
2. Потвърден е протекторният ефект на мелатонина при оксидативно увреждане на стомашната лигавица.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

1. **Hristova M**, Bekyarova G, Tzaneva M. Heme oxygenase-1 upregulated by melatonin: potential protection against burn-induced oxidative gastric mucosal injury. Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific. 2015 Apr-Jun; 21(2):779-783
2. Bekyarova G, **Hristova M**. Uric acid, thiols and burn-induced oxidative injury of gastric mucosa in rats. Scripta Scientifica Medica. 2012; 44 (1), Supplement 1:31-34
3. Bekyarova G, **Hristova M**, Bratchkova Y. Effect of melatonin on burn-induced morphological changes in gastric mucosa. Journal Biomedical & Clinical Research. 2010; 2:93-100

Участия в научни форуми

1. **Hristova M**, Bekyarova G, Atanasova M. Oxidative stress and inflammatory response in burn-induced gastric mucosal injury. Effect of melatonin. 24-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB), 15 - 18 May 2014, Golden Sands, Bulgaria
2. Bekyarova G, **Hristova M**. The potential of melatonin in organ protection in thermal trauma. Seventh national congress of pharmacology “Pharmacology: from experiment to clinical practice”, 17 - 19 October 2014, Medical university – Pleven, Bulgaria. J Biomed Clin Res. 2014; 7(1), Suppl. 1:80
3. Bekyarova G, **Hristova M**. Melatonin protects against burn-induced oxidative injury in remote organs. The 32nd Balkan Medical Week 21-23, September 2012 Nis, Serbia; Abstracts P:130