

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р П. СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“
КАТЕДРА ПО ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ**

Ганка Йорданова Бекярова

**ПРОУЧВАНЕ НА НЯКОИ ВЪЗМОЖНИ МЕХАНИЗМИ
ЗА УВРЕЖДАНЕ НА ЧЕРНИЯ ДРОБ, СВЪРЗАНИ
С ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС В УСЛОВИЯТА
НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ТЕРМИЧНА ТРАВМА
И РОЛЯТА НА МЕЛАТОНИНА
В ХЕПАТОПРОТЕКЦИЯТА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“**

Научна специалност: „Патофизиология“

ЧЛЕНОВЕ НА НАУЧНОТО ЖУРИ:

**Проф. д-р Стефан Костянев, дмн
Проф. д-р Александър Стойнев, дмн
Проф. д-р Негрин Негрев, дмн
Проф. Румяна Бакалова-Желева, дбн
Проф. д-р Адриана Бочева, дм
Проф. д-р Христо Чучков, дмн
Доц. Татяна Янкова, дб**

Варна 2014

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет катедрата по физиология и патофизиология при Медицински университет – Варна, състояло се на 4.07.2014 г. и е насочена защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 225 страници, съдържа 53 фигури 3 таблици. Библиографията обхваща 667 литературни източника, от които 1 на кирилица и 666 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на2014 г. от..... часа в Медицински университет “Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
ВЪВЕДЕНИЕ	7
1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	11
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	13
1. Експериментални процедури и прилагане на мелатонин	
2. Използвани реактиви и субстанции	
3. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ	14
3.1. Имунологични методи	14
• Определяне ниво на експресия на транскрипционния фактор NF-kB (Western blotting).	
• Определяне съдържанието на С-реактивния протеин (турбодиметричен метод).	
3.2. Имунохистохимични методи	15
• Определяне на нивото на експресия на транскрипционния фактор Nrf2	
• Определяне активността на ензима хем-оксигеназа-1	
• Определяне на активността на ендотелната NO-синтаза	
• Определяне на активността на ензима CuZn супероксиддисмутаза.	
• Определяне на съдържанието на про-апоптотичния Вах и анти-апоптотичния Bcl-2 протеини	
• Определяне на нивото на експресия на K 67 пролиферативния маркер.	
• Определяне на съдържанието на 4 хидроксинонена	
3.3. Биохимични и клинично-лабораторни методи	17
• Определяне нивото на про- и анти възпалителни цитокини –	
• Определяне степента на оксидативно увреждане и антиоксидантна защита	
• Определяне на маркерите на чернодробна дисфункция	
• Определяне показатели на хемокоагулацията	
3.4. Хистологични методи	20

4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	21
4.1. Изследване степента на оксидативно увреждане и на антиоксидантна защита на черния дроб при термична травма и ефекта на мелатонина	
4.2. Определяне нивото на експресия на транскрипционния фактор NF- κ B и на някои про-и анти-възпалителни цитокини в черния дроб и плазмата при термична травма и ролята на мелатонина във възпалителния процес	
4.3. Изследване на ендотелната NO-синтаза и на други маркери на ендотелната и микроциркулаторна дисфункция в черния дроб индуцирани от термична травма и повлияването им от мелатонина	
4. 4. Изследване степента на експресия на ензима хем-оксигеназа-1 и на транскрипционния фактор Nrf2 в черния дроб при термична травма и проучване ефекта на мелатонина	
4. 5. Ефект на мелатонина върху вазорегулаторните ензими-ендотелната NO-синтаза (eNOS) и хем-оксигеназа-1 (HO-1) в черния дроб при термична травма	
4.6. Определяне съдържанието на про- и анти-апоптотични протеини и степента на пролиферация в черен дроб при термична травма и установяване ефекта на мелатонина	
4.7. Изследване на чернодробната дисфункция в острия период след термична травма и ролята на мелатонина като хепатопротектор	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ИЗВОДИ	92
СПРАВКА ЗА ОЧАКВАНИТЕ ПРИНОСИТЕ	94
ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	96
ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	97

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

4-HNE	4-hydroxynonenal (4-хидрохиноненал)
ANT	Adenine nucleotide translocase
AP-1	Activated protein -1 (активатор протеин-1)
ARE/ErpRE	Antioxidant/Electrophyl Response Element (Антиоксидант/електрофил респонсен елемент)
aTPT	Активирано тромбопластиново време
AST	Aspartat aminotransferase (аспартат аминотрансфераза)
ALT	Alanin aminotransferase (аланинаминотрансфераза)
Araf-1	Апоптотичен фактор
BAX	Про-апоптотичен протеин
Bcl-2	Анти-апоптотичен протеин
Bid-	Про-апоптотичен протеин
CO	Carbon monoxide (въглероден монооксид)
CRP	C-reactive protein (С-реактивен протеин)
CEK	Синусоидални ендотелни клетки
ChE	Cholinesterase (холинестераза)
COX-2	Cyclo oxugenase-2 (циклооксигеназа-2)
CuZuSOD	Superoxide dismutase (супероксиддизмутаза)
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase-(ендотелна азотоксидна синтаза)
ER-	Ендоплазмен ретикулум
GCL	glutamate cysteine ligase (глутамат цистеин лигаза)
GPx	Glutathione peroxidase (глутатион пероксидаза)
GSH	Glutathione (глутатион)
GST	Glutathione S трансфераза (глутатион- S трансфераза)
HO-1	Heme-oxigenase-1 (хемоксигеназа-1)
HSP-32	Heat shock protein 32
IkB	Инхибитор на NF-kB
IL-6	Interleukin-6 (интерлевкин-6)
IL-10	Interleukin-10 (интерлевкин-10)
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (индуцируема NO- синтаза)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (междуклетъчни адхзионна молекула)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1 (съдовоклетъчна междуклетъчни адхзионна молекула)
JAK/STAT	Janus/ Signal Transducer and Activator of Transcription) сигнален път
MCP-1	Macrophage chemotactic protein (макрофажен хемотаксисен

	протеин)
mtDNA	Mitochondrial DNA (митохондриална ДНК)
MDA	Malon dialdehyde (малонов диалдехид)
MPO	Myeloperoxidase (миелопероксидаза)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (митоген активирана протеин киназа)
MT	Metallothionein (металотионеин)
NF- κ B	Nuclear factor kappa B (нуклеарен фактор капа В)
NO	Nitric oxide (азотен оксид)
Nrf2	Нуклеарен еритроиден фактор
ONOO	Peroxynitrite (пероксинитрит)
PAPR	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PA	Prothrombin activity (протромбинова активност)
p38MAPK	p38 mitogen activated protein kinase (p38 митоген активирана протеин киназа)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase фосфоинозитид-3 киназа
ROS	Reactive reactive species (рактивни форми на кислорода)
RNS	Reactive nitrogen species (реактивни нитрозативни форми)
Trx	Thioredoxin (тиоредоксин)
T-SH	Тотални тиоли
TNF α	Tumor necrosis factor alpha (тумор некрозисен фактор алфа)
TBA	Thiobarbituric acid (тиобарбитурова киселина)
TT	Термична травма
ПНМК	Политенаситени мастни киселени
UA	Uric acid (пикочна киселина)
VDAC	Voltage-dependent anion channels

ВЪВЕДЕНИЕ

Термичната травма (ТТ), считана за една от тежките форми на травматичните увреждания, представлява сериозен клиничен проблем в спешната медицина. Епидемиологичните данни сочат тенденция за увеличаване броя на случаите с термични увреждания в световен мащаб. По данни на СЗО ежегодно между 20-30 хиляди деца и възрастни умират от усложнения вследствие на ТТ.

Термичното поражение на кожата води до локална деструкция на тъканите, акумулиране на токсични продукти от тъканния метаболизъм и освобождаване на цитокини от макрофагите (Ipaktchi K, 2006; Dahiya P, 2009). Цитокините и токсичните липидни пероксиди (алармини), попаднали в системната циркулация и стрес-хормоните предизвикват системен възпалителен отговор (Lenz A et al, 2007).

Черният дроб играе основна роля в системния инфламаторен отговор, хемостазата и метаболизма и има определящо значение за оцеляването и възстановяването на пациентите след термична травма. Клиничните изследвания показват, че чернодробната дисфункция и пораженията в структурата на черния дроб са определящи фактори за преживяемостта на болни с тежки изгаряния (Jeschke MG et al., 2001; Klein D et al., 2004). Патофизиологичните механизми, лежащи в основата на увреждането на черния дроб са сложни, многофакторни и не напълно изяснени.

Повишената продукция на про- възпалителни цитокини при системно възпаление предизвиква активиране на левкоцитите и тяхното акумулиране в отделените от мястото на ТТ органи (Farina JA et al, 2009; Jaffer U et al., 2010). Акумулирането на левкоцитите («левко-секвестрация») и отделянето на протеази (еластаза и металопроотеинази) и свободни радикали екстрацелуларно е един от важните механизми за увреждане на клетките и за вторичните органи поражения при ТТ (Cakir B et al., 2005; Rani M, Schwatecha MG, 2012). Ишемията поради генерализирания вазоспазъм в спланхниковата област и последваща реперфузия (поради вазодилатация) също активират Купферовите и други възпалителни клетки. Повишената продукция на про-възпалителни и намалената на анти-инфламаторни медиатори предизвикват увреждане на паренхимните и на синусоидалните ендотелни клетки (СЕК) в черния дроб (Cakir B Yeşen B, 2004, Gauglitz GG, 2009).

Свръхпродукцията на свободни радикали (ROS) при небалансирана антиоксидантна защита предизвиква оксидативен стрес и вероятно е един от основните механизми на увреждане на черния дроб и други органи при ТТ (Horton JW, 2003; Chen LW et al., 2006; Parihar A et al., 2008; Vinha PP, 2013). Предполага се, че оксидативният стрес допринася за задълбочаване на увреждането на черния дроб чрез взаимосвързани механизми на възпаление, водещо до праймиране на левкоцитите, активиране на липидната пероксидация и оксидативното увреждане на съдовия ендотел и на кръвните клетки, предизвикващи микроциркулаторна и митохондриална дисфункция и евентуално на клетъчна смърт (Farina JA et al., 2013).

По-новите данни доказват, че свободните радикали при определени условия изпълняват важната роля на сигнални молекули и участват в клетъчната сигнализация чрез регулиране активността на транскрипционни фактори (D'Angio et al., 2000; Gloire G et al., 2006; Yuan L & Kaplowitz N, 2009; Jacobs AT & Marnett LJ, 2010; Pizzimenti S et al., 2013). Свободните радикали активират транскрипционни фактори, регулиращи както експресията на ензими от антиоксидантната система на защита, така и на медиатори, активиращи възпалителния отговор и клетъчната смърт.

Въпреки множеството изследвания насочени към проучване на патогенетичните механизми и търсене на нови средства за тяхното повлияване не е постигната необходимата ефективност при лечението на пациентите с увреждания на черния дроб и на другите органи следствие на термичната травма. Сложността на патофизиологичните механизми и тяхната взаимосвързаност налага необходимостта от комплексен подход при лечението на пациентите с изгаряния.

При търсенето на подходящи средства за повлияване увреждането на черния дроб, нашето внимание бе фокусирано върху мелатонина като един от най-силните антиоксиданти, два пъти по-ефикасен от витамин Е и А и три пъти по-активен от глутатиона (Solís Herruzo JA & Solís Muñoz P, 2009; Korkmaz A et al., 2009). Мелатонинът, поради силната си липофилност, може да прониква в клетките и прихваща хидроксилните и пероксинитритните радикали, да повишава експресията на антиоксидантните ензими (Reiter R et al., 2004). Той предпазва клетъчните и митохондриалните мембрани от липидна пероксидация и последваща клетъчна смърт. При оксидативен стрес нивото на мелатонин в кръвта намалява поради неговото изчерпване като ендогенен антиоксидант (Tan DX et al., 2007).

Наред с антиоксидантните свойства мелатонинът притежава анти-инфламаторно, анти-апоптотично и стимулиращо регенерацията действие. Прилагането на мелатонин има доказан протективен ефект при редица патологични процеси и екстремални състояния като сепсис, остър панкреатит, мозъчна травма и интоксикации, с доказан висок оксидативен стрес (Bruck et al., 2004; Wang et al., 2005; Maldonado M et al., 2007; Jung et al., 2009; Mishra et al., 2011; Jaworek J et al., 2012).

Проучването на влиянието на мелатонина върху възпалителния отговор, антиоксидантната защита, ендотелната и микроциркулаторната дисфункция, апоптозата и регенерацията е важно с оглед изучаване ролята му в механизмите на увреждане на черния дроб. Задълбочените научни познания върху патофизиологичните процеси биха допринесли за съществено подобряване и усъвършенстване на комплексното лечение на пациенти претърпяли ТТ и подобряване прогнозата и изхода от това състояние.

МОТИВАЦИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА НАСТОЯЩОТО НАУЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Системният възпалителен отговор, иницииран от медиатори-цитокини и свободни радикали, исхемията и последващата реперфузия и активирането на левкоцитите предизвикват увреждания в отдалечени органи, включително и в черния дроб при ТТ. Ролята на оксидативния стрес и свързаните с него възпаление, ендотелна и микроциркулаторна дисфункция и апоптоза на клетките, които допринасят за увреждането на черния дроб при ТТ, не е напълно изяснена. Мелатонинът има протекторно действие при модели на чернодробно увреждане, но данните за молекулните и клетъчните механизми са доста оскъдни. Анализът на литературните данни показва, че в патофизиологията на чернодробното увреждане при ТТ остават неизяснени редица въпроси.

- Публикуваната информация за антиоксидантните ензими в черния дроб е противоречива. Липсват данни за промените на един от важните маркери на липидната пероксидация - 4 хидроксиноненал (4 HNE)
- В литературата са публикувани данни относно различни аспекти на свободно-радикалните процеси в черния дроб

при ТТ, но ефектът на мелатонина е недостатъчно изследван.

- Има данни за повишаване на антиоксидантната защита след прилагането на мелатонин, но молекулните механизми на тези промени остават неясни.
- Липсва информация за ензима хем-оксигеназа-1 (НО-1) - важен протективен ензим срещу оксидативния стрес, възпалението и апоптозата.
- Много оскъдни са данните относно ефекта от мелатонина върху експресията на вазорегулаторните ензими със синергично действие ендотелната NO-синтаза и хем-оксигеназа-1 при ТТ.
- Ограничена е наличната информация за ролята на редокс-сензитивните транскрипционни фактори NF-κB и Nrf2 като регулатори на възпалителния отговор и антиоксидантната защита при ТТ и ефекта на мелатонина.
- Липсва информация относно взаимовръзката между регулираните от ROS транскрипционни фактори NF-κB и Nrf2 в черния дроб при ТТ.
- Сравнително слабо е проучено влиянието на мелатонина върху нивото на анти-възпалителните цитокини и на CRP като остро-фазов маркер и модулатор на възпалението.
- Слабо проучена е връзката между инфламаторния отговор и нарушенията в хемостазата при ТТ и повлияването от мелатонина.
- Публикуваните данни относно ролята на оксидативния стрес за митохондриалната дисфункция и механизмите на апоптозата и регенерацията в черния дроб при ТТ са недостатъчни.
- Оскъдна е наличната информация относно влиянието на мелатонина върху апоптозата и регенерацията в черния дроб при ТТ.

1. ЦЕЛ

Проучване на някои възможни механизми на чернодробното увреждане, свързани с оксидативния стрес при модел на термична травма и ролята на мелатонина в хепатопротекцията

ЗАДАЧИ

1. Да се изследва степента на оксидативно увреждане чрез определяне нивото на малондиалдехид (MDA), 4 хидроксиналенал (4-HNA), и някои компоненти на антиоксидантната защита като CuZn SOD, пикочна киселина и общи тиоли (в черен дроб и плазма).
2. Да се изследва влиянието на мелатонина върху оксидативния стрес и антиоксидантната защита в черен дроб и плазма.
3. Да се изследват някои показатели на възпалителния отговор в острия период след термична травма:
 - 3.1. Изследване на експресията на транскрипционния фактор NF- κ B в черен дроб.
 - 3.2. Определяне на нивото на про-възпалителните маркери (TNF- α и Il-6) в чернодробен хомогенат и плазма.
 - 3.3. Определяне нивото на анти-възпалителния маркер (IL-10) в чернодробен хомогенат и плазма.
4. Да се проучи влиянието на мелатонина върху системния възпалителен отговор при ТТ.
5. Да се потърси корелация между маркерите на оксидативния стрес и възпалението в черен дроб и плазма.
6. Да се изследва експресията на ензима хем-оксигеназа-1 в черния дроб и връзката му с показатели на оксидативния стрес и възпалението при ТТ.
7. Да се проучи ефекта на мелатонина върху активността на ензима хем-оксигеназа-1 в черния дроб при ТТ.
8. Да се определи експресията на транскрипционния фактор Nrf2-като важен цитопротектор.
9. Да се проучи ефекта на мелатонина върху експресията на транскрипционния фактор Nrf2 в черния дроб при ТТ.
10. Да се изследва апоптозата и регенерацията в черния дроб чрез:
 - 10.1. Определяне експресията на про-апоптотичния Bax протеин.

- 10.2. Определяне експресията на анти-апоптотичния Bcl-2 протеин.
 - 10.3. Промяната в про-/ -анти-апоптотичния индекс (Bax/Bcl-2).
 - 10.4. Определяне на броя на апоптотичните клетки.
 - 10.5. Изследване на Ki 67 пролиферативния маркер.
11. Да се проучи влиянието на мелатонина върху апоптозата и регенерацията в черния дроб при ТТ.
 12. Да се проучи влиянието на мелатонина върху ендотелната и микроциркулаторна дисфункция чрез:
 - 12.1. Изследване на активността на ендотелната NO- синтаза.
 - 12.2. Определяне на нивото на С-реактивния протеин.
 - 12.3. Изследване на флексибилитета на еритроцитите и тромбоцитната агрегация.
 13. Да се изследва чернодробна дисфункция при ТТ чрез:
 - 13.1. Определяне активността на аминотрансферазите (AST и ALT) в плазмата.
 - 13.2. Определяне активността на ензима холинестеразата (ChE) и гама глутамилтрансферазата (GGT) в плазмата.
 - 13.3. Определяне нивото на фибриногена, албумина и билирубина в плазмата.
 - 13.4. Определяне на някои показатели на хемокоагулацията (РА и аТРТ).
 14. Да се проучи ефекта на мелатонина върху чернодробната дисфункция и хистологичните промени в черния дроб при ТТ.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Експериментални процедури и прилагане на мелатонин

Използвани са 120 мъжки бели мъжки плъха порода Wistar с тегло 250-280 g (възраст 10-12 седмици), отглеждани при температура 20-25 ° C и свободен достъп до храна и вода. Всички опитни процедури са провеждани съобразно националните принципи за експериментални животни и са в съответствие с директивите на Европейския съюз.

Животните са разпределени основно в четири групи: 1) Sham (контрола) (K); 2) Sham, третирани с мелатонин (Мел); 3) животни с термична травма (ТТ); 4) животни с ТТ; третирани с мелатонин (ТТ+Мел). На животните преди ТТ е приложена обща анестезия с тиопентал 30мг/кг интраперитонеално (i.p). Термична травма е предизвикана на добре застригана кожа с гореща вода (90°C, 10 сек) на площ 20 % от общата телесна повърхност. Тя е последвана от вливане на 4 мл физиологичен разтвор, приложен интраперитонеално. Кожата по гърба на Sham животните е потапяна 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 мг/кг (разтворен в 0.5 мл физиологичен разтвор съдържащ 0.1 мл 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 мг/кг мелатонин е оптимална и ефектът се получава на 24 ч и при други модели на чернодробно увреждане (Kang JW, Lee SM, 2012; Ding K et al, 2014). След инжектиране на анестетика е взета кръв за изследване от вена югуларис на 24 ч след ТТ.

2. Приготвяне на тъканен хомогенат и парафинови блокчета от черен дроб

Черният дроб веднага се отпрепарира, претегля и поставя в студен физиологичен разтвор. Кръвта се центрофугира за пет минути при 1000 x g и всички проби се съхраняват при t-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, 10 min, 4°C.

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

3. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

3.1. Имунологични методи

3.1.1 Определяне на степента на експресия на NF-κB

Експресията на NF-κB в черния дроб е определена чрез Western blotting. Пробите от черния дроб са хомогенизирани в 50mM PBS, pH=7.4 . След центрофугиране при 10000g за 10 min тъканните хомогенати, съдържащи еднакви количества белтък са сепарирани в SDS-PAGE прехвърлени към polyvinylidene difluoride мембрани. След блокиране с 5% обезмаслено мляко в TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.6) мембраните са инкубирани в подходящи първични антитела поликлонални заешки анти-NF-κB (C 20 Santa Cruz) или моноклонални анти-β actin (AC-15, Sigma) и след това са инкубирани с вторични антитела с експозиция 1 час при стайна температура. Имунореактивните протеини са визуализирани чрез IR- белязани вторични антитела (IR Day 800 CW, IR Day 680; LiCor) и съдържанието на NF-κB μmol/g е определено на Odissey апарат.

3.1.2.Определяне на плазменото ниво на C-реактивен протеин /CRP-S/ и на фибриноген

Нивото на C-реактивния протеин/CRP-S/ е определено чрез имунотурбидиметричен метод на Thompson, D et al (1992). Имунологичната част на метода е реализирана чрез реактив, усилен с миши частици CRP, аглутиниращи с латексови частици, обвити с моноклонални анти-CRP, антитела. Анализът е извършен на биохимичен анализатор Olympus-400 plus. Фибриногенът в плазмата е определен по метода на Clauss (2000) Резултатите са представени като mg/L.

3.2. Имунохистохимични методи

Чрез използване на имунохистохимични методи е определена експресията на : хем-оксигеназа-1 (HO-1), транскрипционния фактор Nrf2, проапоптотичния Bcl-2 протеин, анти-апоптотичния (Bax) протеин, ендотелната NO-синтаза (eNOS), Cu/Zn супероксиддизмутаза (Cu/ZnSOD), Ki 67 пролиферативен маркер, 4 хидроксинонена (4-HNE).

Използвани субстанции за имунохистохимични процедури

Антитяло	Фирма	Разреждане
4 hydroxynonenal	Abcam Cambridge, UK	1:200
Nrf2 (C-20)	Santa Cruz , USA	1:50
Heme oxygenase 1 (C-18)	Santa Cruz, USA	1:50
Bcl-2 (N-19)	Santa Cruz , USA	1:50
Bax (C-20)	Santa Cruz , USA	1:50
eNOS	DAKO, USA	1:50
Cu/Zn SOD	DAKO, USA	1:50
K67 пролиферативен маркер	DAKO, USA	1:50

Имунохистохимичното изследване е извършено с моно- или поликлонални антитела върху парафинови срези с FLEX Mini kit high pH DAKO K8024. Използвани са срези с дебелина 4 μ m които се монтират върху силанизирани стъкла (Thermo Polysine). Срезите се депарафинират 3 x 5 мин. в ксилен след което се поставят в алкохолни разтвори с нарастваща концентрация. Промиват се трикратно с течаща вода с последващо трикратно промиване с

десетилирана вода. Антигенното възстановяване се извършва на водна баня при температура 95°C. Препаратите се инкубират на 65°C в буфер с pH 9 (Target Retrieval Solution, High ph) и темперират на водна баня 95°C за 20 мин. Пробите се охлаждаат 20 мин до 65° с последващо .промиване с измиващ буфер (FLEX Wash Buffer20x) за 10 мин.

Процедура с FLEX Mini kit (K8024).

Всички последователни етапи се провеждат във влажна камера както следва:

1. Инкубация с 3% H₂O₂ за 5 мин. при стайна температура.
2. Промиване с измиващ буфер за 5 мин. при стайна температура.
3. Инкубация с първичното антитяло за 20 мин. при стайна температура.
4. Промиване с измиващ буфер 2 пъти по 5 мин. при стайна температура.
5. Инкубиране с HRP за 20 мин. при стайна температура.
6. Промиване с измиващ буфер 3 пъти по 5 мин. при стайна температура.
7. Инкубиране с DAB хромоген за 10 мин. (2 x 5 мин.).DAB хромогена се приготвя по време на 3-тото измиване сбуфер (1 мл. субстрат + 1 капка DAB).
8. Промиване с буфер за 2 мин.
9. Промиване с течаща вода за 2 мин.
10. Контраоцветяване с хемалаун за 2 – 3 мин.
11. Промиване на течаща вода за 2 мин.
12. Алкохолен разтвор, ксилен, балсам.
13. 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:

- Негативни клетки – нямащи отложен преципитат коефициент – 0;
- Слаба по интензивност имунна реакция – 1;

- Умерена по интензивност имунна реакция – 2;
- Изразена по интензивност имунна реакция – 3.

Морфометричното изследване е извършено върху 50 клетки от всяка проба в зоните на най-интензивна реакция. Интензивността на имунната реакция е представена като средна стойност.

3.3. Биохимични и клиничко-лабораторни методи

3.3.1. Определяне нивото на про-възпалителните цитокини -IL-6 и TNF α и анти- възпалителния цитокин -IL-10 в чернодробен хомогенат и плазма

Нивото на проинфламаторните цитокини IL-6 и TNF α както и на антиинфламаторния цитокин IL-10 е определяно с търговски ELISA кит на Gen-Probe Diaclone SAS, Besancon Cedex, France. Резултатите са представени в pg/ml (плазма и хомогенат).

3.3.2. Определяне на протромбиновото време (активност) (РА) и активираното парциално тромбoplastиново време (аРТТ)

Използвана е цитратна плазма, която се събира в епруветки, изработени от пластмаса или силиконови чаши и се съблюдава съотношението на кръвта (9 части) към разтвор на натриев цитрат 0,11 U (1 част) за определянето на РА (Loeliger EA, 1992) и аРТТ (Villanova PA, 1992). Плазмата се отделя чрез центрофугиране при 2500g за 15 минути и се съхраняване при 18-25° C в продължение на 8 часа. По отношение на РА, добавянето на калциев тромбoplastин към цитратна плазма инициира каскада от реакции от външната коагулационна система резултиращо в образуване на фибринов съсирек. Времето, което предхожда появата на кръвосъсирването в сравнение с времето когато се използва нормален стандарт. РА е изразено в %. При изследване аРТТ реагентът се смесва с плазма на плъхове за осигуряване на оптимално и равномерно активиране на пробата. След инкубиране на 37°C за пет минути, реакцията се инициира чрез добавяне на Trini CLOT аРТТ S CaCl₂. Засича се времето в секунди, необходими за образуване на тромб.

3.3.3. Методи за оценка на степента на оксидативно увреждане и антиоксидантна защита

3.3.3.1. Определяне съдържанието на малонов диалдехид

Ендогенният продукт на липидната пероксидация *малонов диалдехид* (MDA) (плазма и хомогенат на черен дроб), реагиращ с тиобарбитурова киселина (TBA) е определен по спектрофотометричния метод на *Porter et al. (1976)*. Резултатите са изчислени чрез използване на моларен екстинкционен коефициент на MDA-TBA-комплекс при 532 nm = $1.56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ и са представени като nmol MDA/ml плазма, nmol MDA/g тъкан и nmol MDA/mg протеин.

3.3.3.2. Определяне нивото на тоталните тиоли

Съдържанието на тотални тиоли (T-SH) в плазма и в чернодробен хомогенат 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 $\mu\text{mol/mL}$.

3.3.3.3. Определяне нивото на пикочна киселина

Съдържанието на пикочната киселина (UA) в плазмата е изследвано по метода на Bergmeyer, основан на способността на уратите да редуцира фосфоволфрамовата 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 $\mu\text{mol/ml}$.

3.3.4. Маркери на чернодробната дисфункция

3.3.4.1. Определяне на активността на ензимите аспартатамино-трансфераза и аспартат-амино-трансфераза

Активността на аспартат-амино-трансфераза (AST) и аланинамино-трансфераза (ALT) в плазмата е определена чрез UV тест на Варбург /тестът следва препоръките на IFCC. Принцип на

метода: AST катализира трансфера на аминокгрупата между L-аспартата и 2-оксиглутарата до образуване на оксалацетат и L-глутамат. Оксалацетатът реагира с NADH в присъствието на малат дехидрогеназа (MDH) и се образува NAD⁺. Скоростта на оксидиране на NADH е право пропорционална на каталитичната активност на AST. Тя се определя чрез намалението на абсорбцията. Анализът е извършен на биохимичен анализатор Olympus-400 plus. Резултатите са представени като U/L.

3.3.4.2. Определяне на активността на ензима γ -глутамил-трансфераза (GGT)

Активността на γ -глутамил-трансфераза (GGT) е определена чрез ензимен-колориметричен тест. Принцип на метода GGT прехвърля гама-глутамил-групата на L-гама-глутамил-3-карбокси-4-анилид към глицил-глицин. Количеството на освободения 5-амино-2-нитробензоат е пропорционално на активността на GGT в пробата. Определя се чрез фотометрично нарастване на абсорбцията. Резултатите са представени като U/L.

3.3.4.3. Определяне на активността на ензима холинестераза

Активността на холинестеразата /HCE-S/ в плазмата е определена чрез колориметричен тест, при който CHE (холинестераза) катализира бутирилхолина до бутират и тиохолин. Тиохолинът редуцира жълтия хексацианоферат до безцветен продукт. Промяната в интензивността на оцветяване се регистрира фотометрично. Анализът е извършен на биохимичен анализатор Olympus-400 plus. Резултатите са представени като U/L.

3.3.4.4. Определяне на концентрацията на албумин

Концентрацията на серумните белтъци е определена чрез колориметричен метод. Тестът реализира условия на средата pH 4,1, албуминът показва катийонен характер и свързва бромкрезол-зелено (BCG)-анионно багрило до образуване на синьо-зелен комплекс. Абсорбцията на комплекса му е право пропорционална на съдържанието на албумина в пробата. Анализът е извършен на биохимичен анализатор Olympus-400 plus. Резултатите са представени като g/ L.

3.3.4.5. Филтрационен метод за определяне на флексибилитета на еритроцитите

Флексибилитетът на еритроцитите е определен по филтрационния метод на Tannert C & Lux W (1981). Филтрационният елемент съдържащ филтърна FN-4 хартия (Germany) се поставя хоризонтално. 200 μ l изотоничен разтвор се накапва върху хартията с вертикално поставена пипета. Времето, необходимо за растилане на капката се отбелязва с t_c . След 60s 20 μ l еритроцитна суспензия с хематокрит точно 60 s се накапва точно в средата на предшестващото петно. Времето за разтилане на еритроцитната суспензия се отбелязва t_s . Деформабилитетът на еритроцитите се определя по t_c/t_s индекс.

3.4. Хистологични методи

3.4.1.Светлинномикроскопско изследване - оцветяване с хематоксилин еозин

Използвани реактиви

Всички използвани химикали и реактиви са с качество „за анализ“, произведени от фирмите: Merck, Fluka. Моно- или поликлонални антитела на фирмите Sigma-Aldrich Abcam Cambridge, DAKO, USA UK, Santa Cruz, USA, Визуализираща система horse-radish peroxidase-conjugated DAKO staining system (DAKO InVision, Carpenteria, CA., Търговски ELISA кит на Gen-Probe Diaclone SAS, Besancon Cedex, France

Статистически анализ

За статистическата обработка на резултатите са използвани с ANOVA тест, чифтен t-тест на Student (95% доверителен интервал), корелационен анализ за определяне на коефициент на корелация (r). Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартна грешка (Mean \pm SEM). За статистически достоверни са приети различия при ниво на значимост $p < 0.05$. Използвани са статистическите програми Excel и GraphPadPrism .5 (Graph Pad Software, Inc).

4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Изследване степента на оксидативно увреждане и на антиоксидантна защита на черния дроб при термична травма и ефекта на мелатонина

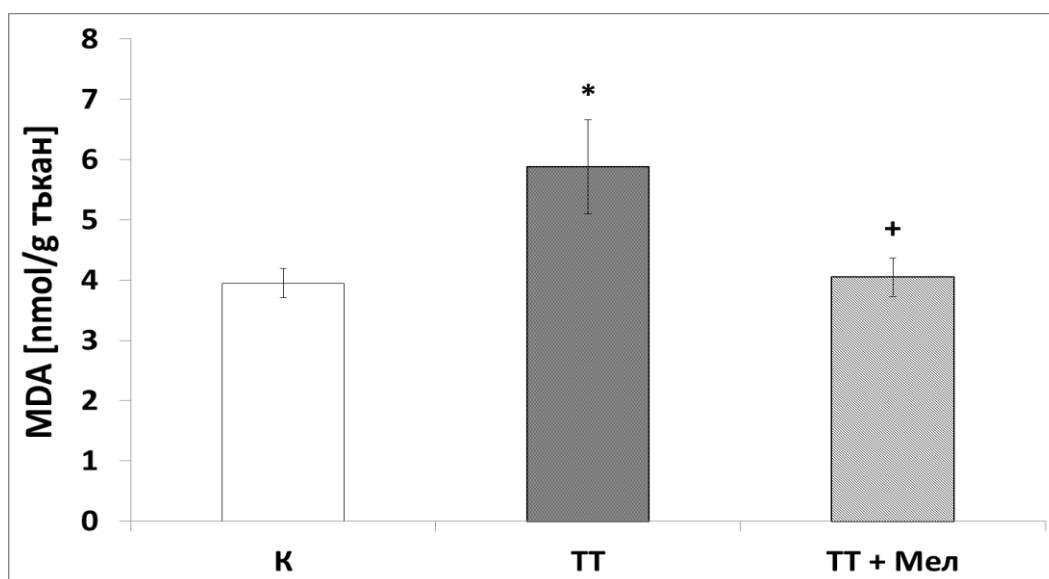
Свръхпродукцията на свободни радикали (ROS и RNS) при ТТ, предизвикваща оксидативен стрес се смята за един от важните механизми в патофизиологията на термичната травма (Bauer V, Bauer F, 1999; Horton JW, 2003; Chen LW et al., 2006; Parihar A et al., 2008; Park BK et al., 2010). Предполага се, че оксидативният стрес допринася за възникване и задълбочаване на увреждането на черния дроб и други органи чрез различни взаимосвързани механизми: възпаление водещо до активиране на левкоцитите, оксидативно увреждане на синусоидалните клетки и на кръвните клетки, съпроводено с пероксидация и увреждане на протеините и DNA в митохондриите (Dehne MG, 2002; Demling RH, 2001; Chen LW et al., 2006). Идентифицирани са оксидативните процеси, които водят до образуване на модулатори на апоптозата (Chaudhary P et al, 2010; Dalleau S, 2013). През последните години се използват нови маркери, даващи по-точна представа за степента на оксидативното увреждане, какъвто е 4 хидрокси-ноненалът (4-HNE) (Chapple SJ et al., 2013; Pizzimenti S et al., 2013). 4-HNE може да модулира широк спектър от процеси в клетката, някои от които допринасят за адаптивните цитопротективни отговори, докато други стимулират увреждането на клетката и дори клетъчната смърт (Chen Z & Niki E 2006). До този момент не е намерена информация за изследването на този маркер на оксидативния стрес при индуцирани от ТТ-тъканни увреждания.

4.1.1. Степен на оксидативно увреждане на черния дроб

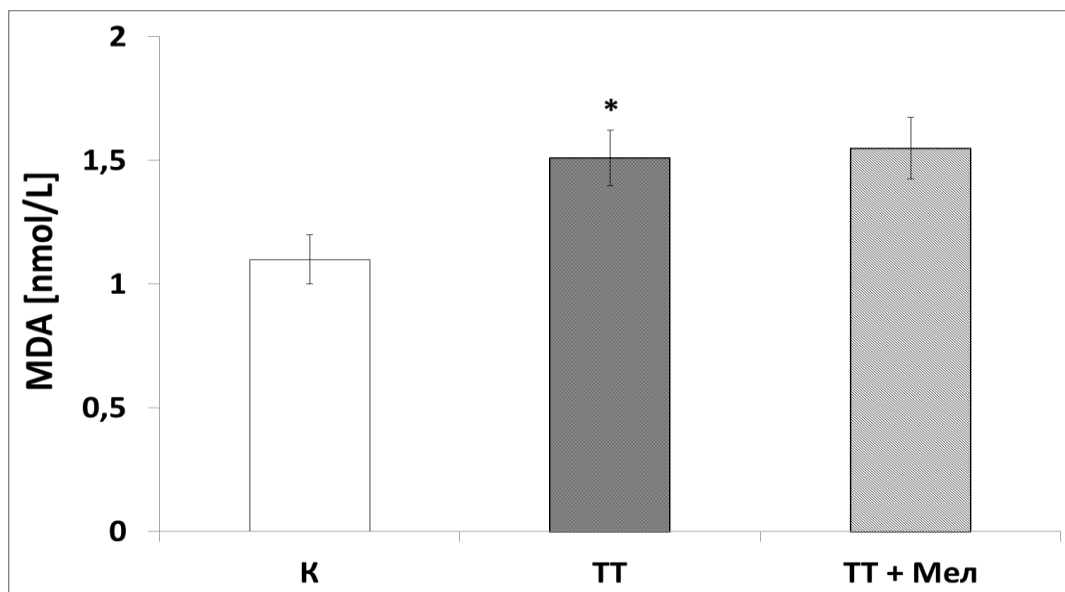
Преки доказателства за активиране на липидната пероксидация има при експериментални модели и при пострадали с термични увреждания. Малондиалдехид (MDA) е един от най-често използваните маркери на оксидативно увреждане на черния дроб. Определено е и нивото на диалдехида 4-хидроксиноненал (4-HNE) - един по-сигурен и информативен маркер за оксидативното увреждане на тъканите при ТТ.

4.1.1.1. Съдържание на малондиалдехид в чернодробен хомогенат и в плазма

Съдържанието на MDA в черния дроб се повишава с 48 % ($p < 0.05$) на 24 след ТТ в сравнение с това на контролната група. (фиг.-1.1.1). Нивото на MDA намалява с 45% ($p < 0.05$) в групата с ТТ+ Мел след ТТ и достига до стойности близки до тези на контролната група. Нивото на MDA в плазмата се повишава с 37% ($p < 0.05$) в сравнение с това на контролните животни. С тенденция за намаляване, но без достигане на статистическата значимост е промяната в концентрацията на MDA в плазмата след прилагане на мелатонин в острия период след ТТ (фиг.-1.1.2)



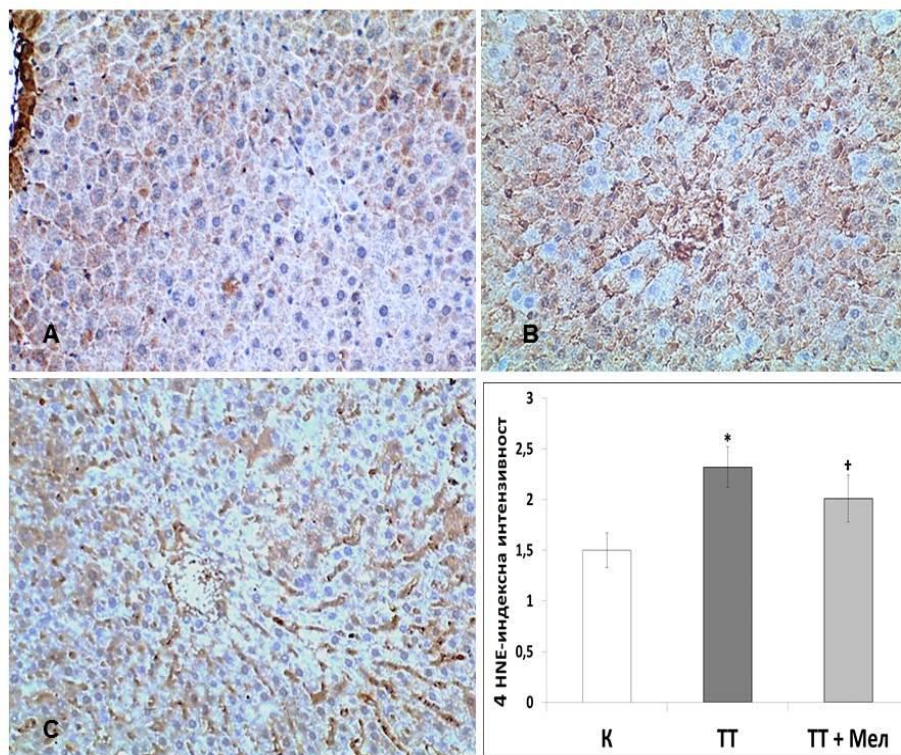
Фигура 1.1.1. Промени в нивото на MDA в чернодробен хомогенат при термична травма и въздействие с мелатонин. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ в сравнение на това на контролната група; + $p < 0.05$ в сравнение с това на ТТ групата



Фигура 1.1.2 Промени в плазменото ниво на MDA (nmol/L) след термична травма и въздействие с мелатонин. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *P<0.01 спрямо контролната група.

4.1.1.2. Експресия на 4- хидроксиноненал (HNE) в черен дроб

Имунохистохимичното изследване показва, че 4-HNE е експресиран в някои от синусоидалните ендотелни клетки (CEK) и хепатоцити в контролната група. Интензивността на имунната реакция варира от лека до умерена степен (1.16±0.29) (фиг.-1.1.2.) Броят на 4-HNE-положителните клетки се увеличава с 144%, p<0.01) в черния дроб в групата с ТТ спрямо този в контролната група. Средното съдържание на 4-HNE в черния дроб е 2.84±0.69. Интензивността на имунната реакция в CEK и хепатоцитите намалява в групата с ТТ+М спрямо тази на ТТ групата (с 47%, p<0.05), но стойностите остават достоверно са по-високи от контролните.



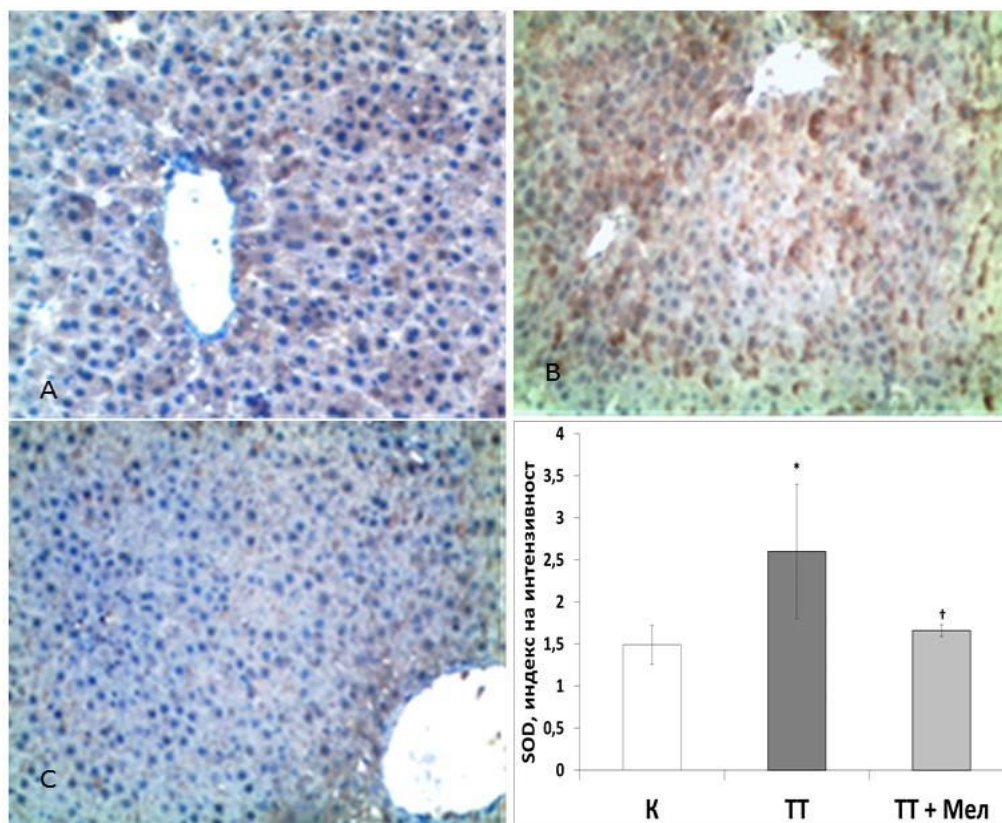
Фигура 1.1.2. Имунохистохимичен анализ на 4-HNE в черен дроб на контролни животни (A), с ТТ (B) в групата ТТ+Мел (C). Интензивността на имунната реакция нараства в СЕК и хепатоцитите в групата с ТТ (B). Мелатонинът намалява експресията на 4-HNE (достоверно) в групата ТТ+ мелатонин (C) в сравнение с ТТ групата. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност, * $p < 0.05$ спрямо контролната група; † $p < 0.05$ спрямо ТТ група.

4.1.2. Антиоксидантна защита в черен дроб и плазма

Супероксиддисмутазата е един от ензимите, които контролират биологичните ефекти на образуваните свободни радикали и участва в „първата линия“ на антиоксидантната система на защита. Противоречиви данни са докладвани за активността на този ензим в черния дроб (Wu Q, and Huang K, 2004; Agay D et al., 2005) и все още няма общоприето становище как се променя активността на този ензим под влияние на мелатонина при ТТ.

4.1.2.1. Експресия на ензима CuZn супероксиддисмутаза в черен дроб

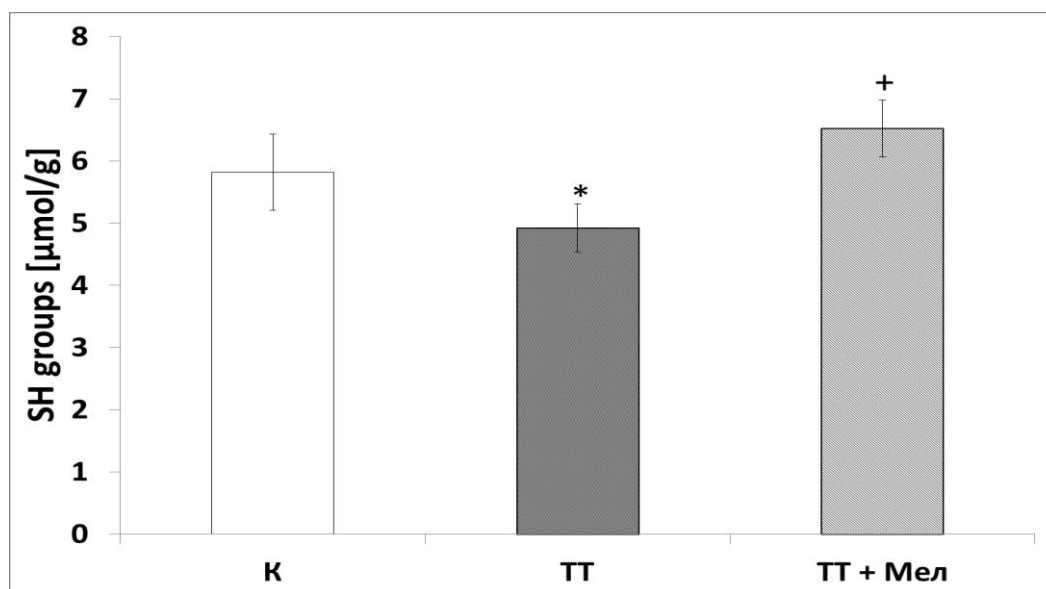
Имунохистохимичното изследване на CuZn SOD показва слаба експресия в хепатоцитите и СЕК в контролната група. Средното съдържание на Cu/Zn SOD в тези клетки на черния дроб е 1.49 ± 0.23 (фиг.-1.1.2.A). Интензивността на имунната реакция в отделните клетки е умерена или силно изразена в ТТ групата. Средното ензимното съдържание е 2.60 ± 0.08 и е по-високо (с 74%, $p < 0.05$) спрямо това в контролната група (фиг.-1.1.2.B). Експресията на CuZn SOD в хепатоцитите и СЕК в ТТ+М групата варира от слаба до умерена степен. Средното съдържание на CuZn SOD протеин (1.66 ± 0.07) е близко до това на контролите животни (фиг.-1.1.2.C).



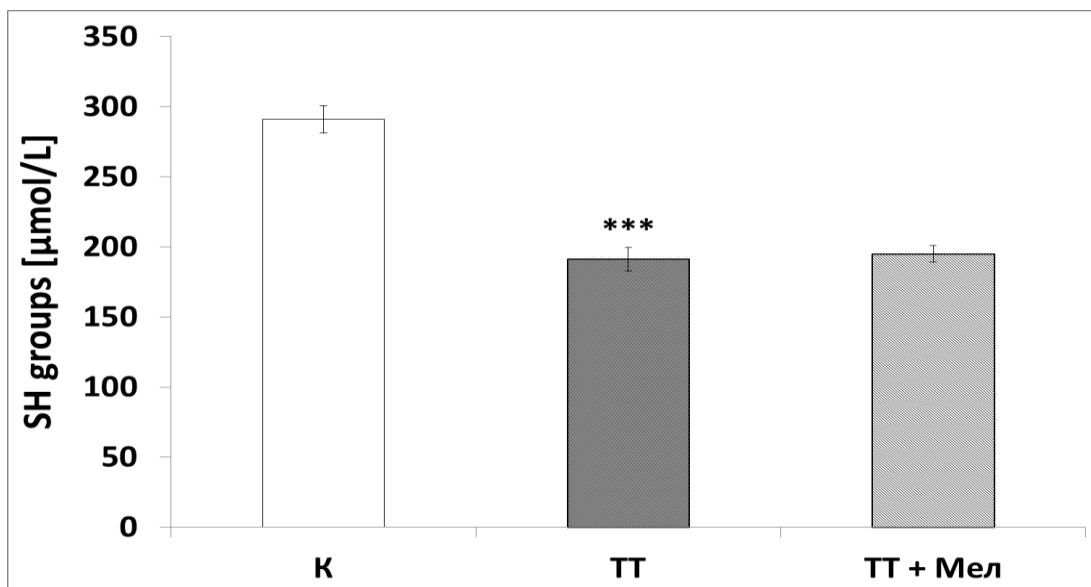
Фигура 1.2.1. Имунохистохимичен анализ на CuZnSOD в черен дроб на контролни животни (A), с ТТ (B) в групата ТТ+Мел (C). Интензивността на имунната реакция е повишена в СЕК и хепатоцитите на 24-ч след ТТ. Средното съдържание на ензима в черния дроб след въвеждане на мелатонин не се отличава от това при контролните групи. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност, * $p < 0.05$ спрямо контролната група; † $p < 0.05$ спрямо ТТ група.

4.1.2.2. Ниво на тотални тиоли в чернодробен хомогенат и плазма

Нивото на тоталните тиоли (T-SH) в чернодробен хомогенат намалява в ТТ-групата в сравнение с контролната група с 35 % ($p < 0.001$) на 24 час ((фиг.1.2.2.1). В групата третирана с мелатонин нивото на тиоловите групи в черния дроб се повишава с 44% ($p < 0.05$) спрямо това на групата с ТТ. 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.1.2.2.2). Мелатонинът не променя достоверно нивото на тиоловите групи след ТТ в сравнение с това на ТТ-групата.



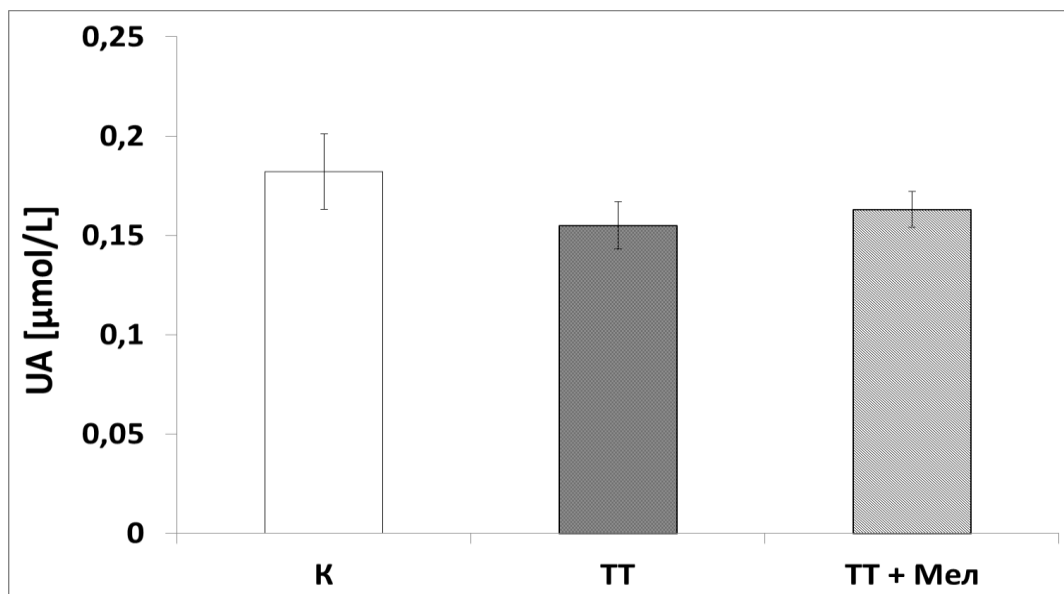
Фигура 1.2.2.1. Ефект на мелатонина върху нивото на общите тиоли (T-SH) в черен дроб . Контролната група (K) ($n=12$) , в групата с ТТ($n=12$) и в групата ТТ+Мел ($n=12$). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност * $p < 0.001$ в сравнение с контролната група. + $p < 0.05$ в сравнение с ТТ групата.



Фигура 1.2.2.2. Ефект на мелатонина върху плазменото ниво на общите тиоли (T-SH). Контролната група K (n=12), в групата с TT(n=12) и в групата TT+Мел (n=12). Даните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** p<0.001 в сравнение с контролната група.

4.1.2.3. Ниво на пикочна киселина в плазмата

Плазменото ниво на пикочната киселина (UA) в TT група намалява, но разликите не са статистически достоверни спрямо това в контролната група. В TT+Мел групата концентрацията на пикочната киселина в плазмата не се различава достоверно от това на TT група (фиг.-1.2.3.)



Фигура 1.2.3. Ефект на мелатонина върху плазменото ниво на пикочната киселина (UA). К (контролна (n=12), групата с ТТ (термична травма) (n=12) и в групата ТТ+Мелатонин (n=12). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност.

4.1.3.1. Обсъждане

От резултатите представени на фиг-1.1.1 ; фиг-1.1.2 се вижда, че нивата на MDA и 4-HNE са повишени, което е сигурен биохимичен маркер за развитието на липидна пероксидация. Повишена е и експресията на Cu/Zn SOD, намалено е съдържанието на T-SH в черния дроб (фиг.1.2.3.) и е повишена активността на AST и ALT в плазмата, като израз на чернодробната дисфункция при животните с ТТ в сравнение със здравите контроли (фиг.7.1). Прилагането на мелатонин по схема води до понижени нива на MDA и 4-HNE в черния дроб, намалена плазмена активност на трансаминазите (AST и ALT) и повишени нива на T-SH в черния дроб и плазмата на приемалите спрямо стресираните, но неприемали препарата животни. Тези данни показват, че мелатонинът ограничава оксидативното увреждане и чернодробната дисфункция, приложен непосредствено след ТТ. Много близки до нашите резултати получават и други автори, които прилагат същата доза мелатонин (10 мг/кг) при ТТ (Sener et al, 2002). Схемата за прилагане на мелатонина и получените резултати от изследване на биохимичните и имунохистохимични маркери на оксидативния стрес ни подсказват, че той се включва в

овладяването на оксидативния стрес в ранния етап на патофизиологичните увреждания. Литературните данни показват, че прилаганата доза от 10 мг/кг мелатонин е оптимална и ефектът се получава на 24 час и при други модели на чернодробно увреждане (Kang JW & Lee SM, 2012; Ding K et al., 2014). Вероятно липофилната структура на мелатонина и способността му за лесно проникване в клетките и субклетъчните структури от една страна и повишеният пермеабилитет на оксидативно увредените ендотелни клетки от друга повишават ефективността на неговото биологично действие. Тези факти обуславят неговата по-ефективна антиоксидантна функция, в сравнение с другите липофилни антиоксиданти като витамин Е, каротеноиди и др.

Повишеното генериране на свободни радикали се смята за един от важните механизми, участващи в патофизиологията на уврежданията в отдалечени от мястото на термовъздействието органи при ТТ, включително в черния дроб (Horton JW, 2003, Vinha PP, 2013). Съществуват доказателства, че циркулиращите левкоцити са хиперактивирани след термовъздействието и генерират в големи количества свободни радикали, цитокини (Chen LW et al, 2006). Bartha et al. (2011) доказват, че повишеното генериране на кислородни радикали и възпалителни медиатори в левкоцитите при ТТ се дължи на повишената активност на ензима PARP (поли-(АДФ) рибозополимераза (poly (ADP)-ribose-polymerase). Възможен механизъм за праймирането на левкоцитите е повишеното ниво на Ca^{2+} и активирането на протеинкиназата (PKC) (Sayeed MM, 2000).

Термичната травма предизвиква исхемия в спланхниковата област и неадекватна перфузия. Това нарушава клетъчния метаболизъм и повишава продукцията на активните форми на кислорода, увреждащи тъканите при отслабена антиоксидантна защита (Burns, 1998; Parihar A et al, 2008). Един от основните източници на супероксидни радикали и още по-токсичните хидроксилни радикали, активиращи липидната пероксидация е ксантин-ксантинооксидазната система. Активирането на ксантин-ксантинооксидазната система (ХО) при исхемия и последващата реперфузия променя метаболизма на пуриновите бази, при което се засилва продукцията на супероксидни аниони и пикочната киселина. Нашите данни показват, че нивото на пикочната киселина в черния дроб не се променя достоверно, което не изключва генериране на супероксидни аниони по този механизъм в по-късните срокове след термовъздействието.

Другите механизми на усилено генериране на активни форми на кислорода се свързват с освобождаването на Fe^{2+} от хемолизиралите еритроцити (Beckarova G et al., 1994), с активирането на липооксигеназния път от метаболизма на арахидоновата киселина (Cetinkale et al., 1999). Повишено е образуването на свободни радикали при митохондриална дисфункция в условията на хипоксия и нарушен кислороден метаболизъм при ТТ (Parihar A et al, 2008), но кой от оксидативните пътища е доминантен е трудно да се определи.

Супероксиддисмутазата е антиоксидантен ензим в клетките, неутрализиращ директно супероксидните радикали, участващи в инициране на свободно-радикалните процеси в острия период след ТТ. Литературните данни относно активността на Cu/ZnSOD са доста противоречиви. Активността на този ензим нараства според Agay D et al. (2005) или намалява според Wu Q & Huang K (2004) в черния дроб при ТТ. В настоящото проучване е установена завишена експресия на Cu/ZnSOD в паренхимните и непаренхимните клетки в черния дроб в острия период след термичната травма спрямо контролата (фиг 1.2.1). Вероятно увеличената Cu/ZnSOD активност се дължи на свръхпродукция на супероксиди при активиране на XO система, както и на активацията на левкоцитите в условията на исхемия и последваща реперфузия в ранния период след ТТ.

Повишаването на активността на ензима Cu/ZnSOD е вероятно компенсаторен механизъм на хепатоцитите за справяне с повишеното генериране на супероксиден анион и евентуално предотвратяване на по-нататъшно оксидативно увреждане на чернодробната тъкан вследствие на ТТ.

Друг възможен механизъм за повишената активност на Cu/Zn SOD е мобилизирането на Cu^{2+} и Zn^{2+} и насочването им от циркулацията към чернодробните клетки още в първите часове и дни след термичната травма и включването им в синтез на нови ензими (Ding HQ et al., 2002; Agay D et al., 2005). Доказана е дистрибутивната роля на някои цитокини като IL-1 β и IL-6 при мобилизиране на Zn^{2+} и Cu^{2+} от циркулацията към черния дроб за синтез не само на Cu/Zn SOD (Ding HQ et al, 2002), но и на металотионеини, ензими играещи важна роля за неутрализацията на свободните радикали и ограничаване на последващите свободно-радикални процеси, индуцирани от ТТ (Zhou ZB et al., 2003).

Chang SC et al (2001) доказват, че Cu/Zn SOD осигурява протекция срещу токсичния ефект на NO и цитокин-медираната токсичност чрез намаляване съдържанието на IL-1 и TNF α ,

участващи като регулатори на NO при *in vitro* изследвания. Транскрипционният NF- κ B и проинфламаторните цитокини (TNF α и IL-1) повишават експресията на Cu/Zn SOD, което подсказва, че активирането на Cu/ZnSODmRNA играе важна роля в протекцията на клетките срещу медиацията от възпалението оксидативен стрес (Bang RL et al., 2000).

Следователно, повишената активност на Cu/ZnSOD не трябва да се интерпретира като усилване на антиоксидантните възможности на черния дроб при намалена или липсваща промяна в активността на другите компоненти на антиоксидантната защита.

Свърхпродукцията на активни форми на кислорода и азота може да изчерпи антиоксидантния капацитет и да предизвика оксидативен стрес, който може да увреди DNA, протеините и липидите в клетките, водейки до акумулиране на клетъчно увреждане. Увеличеният оксидативен стрес повишава нивата на продуктите на липидната пероксидация (MDA и 4-HNE) в черния дроб, което е доказателство за оксидативното увреждане на този орган. Тези алдехиди са способни да реагират с широк спектър биомолекули (аминокиселини, протеини и DNA) в клетките като променят тяхната функция и хомеостаза (Comporti M et al., 1998). MDA и 4-HNE взаимодействат лесно със SH групите на протеини и на нискомолекулни тиоли като GSH и ги окисляват. От друга страна GSH като субстрат на ензима GST има ключова роля в клирънса на 4-HNE в клетката (Reichard JF et al., 2003). Тези автори установяват, че експресията на 4-HNE при имунохистохимични изследвания се повишава много преди да са настъпили промени в биохимичните маркери и при хистологичните изследвания.

Повишаването на нивата на MDA и 4-HNE е причина за изчерпването на тиолите, които играят важна роля в поддържането на редокс-баланса и антиоксидантната защита на клетките в черния дроб. Установеното от нас намалено ниво на T-SH (фиг. 1.2.2) предполага каталитично инактивиране на протеини и загуба на специфични клетъчни функции. Функционална последица от това намаление може да бъде изместването на редокс-статуса в клетките по посока на оксидативните процеси. Това предположение се подкрепя от факта, че животни с ТТ имат ниско съдържание на T-SH и по-високо ниво на продукти на липидната пероксидация в сравнение с контролата.

Намаляването на нивото на T-SH поради окислението им от свободните радикали в черния дроб е вероятен механизъм за понижаване на активността на глутатион пероксидазата (GPx), на редуцирания глутатион, както и на антиоксидантния капацитет на

организма като цяло при ТТ (Ding HQ et al., 2002; Sandre et al., 2004). В наше предишно проучване са установени ниски концентрации на други важни антиоксидантни витамини Е и А (Bekyarova G et al., 1996), на церулоплазмин (Bekyarova G et al., 1996). Намалено е плазменото ниво и на други на ниско-молекулни антиоксиданти като пикочна киселина, билирубин и албумин.

Увреждащият ефект на 4-HNE се свързва с образуването на ковалентни аддукти с протеини в клетката, включително и в плазмената мембрана, с модифициране на специфични клетъчни функции (Arashiki N et al., 2010). 4-HNE може да формира аддукти с DNA, но също с високореактивни фосфолипиди, съдържащи полиненаситени мастни киселини (ПНМК) като арахидонова и линоненова киселина и нуклеофилните аминокиселини (цистеин, хистидин и лизин ремнанти) (Catalá A, 2009). Освен това, 4-HNE може да се свързва ковалентно с тиолите на лизина и да образува Шифови бази (стабилни аддукти), което води до тежко увреждане на мембранните протеини и промени в техните свойства (Niki E et al., 2009). Липидната пероксидация и деградацията на мембранните протеини са причина за увреждане на клетъчните и субклетъчните мембрани в хепатоцитите и за повишаване на активността на плазмените трансаминази, отразяващи увредената функция на чернодробния паренхим (Sener G et al., 2002, 2005; Sun BW et al., 2008).

Резултатите от настоящото изследване показват, че мелатонинът предотвратява повишаването на нивото на MDA и 4-HNE и намаляването на концентрацията на T-SH в черния дроб. Това заключение се подкрепя и от данните на други автори, според които протективният ефект на мелатонина (10мг/кг) е свързан с ограничаване на липидната пероксидация и с повишаване активността на GPx, както и на нивото на редуцирания глутатион не само в черния дроб, но и в други органи при ТТ (Sener G et al., 2002a). Хепатопротективен ефект на мелатонина бе доказан и чрез намаляване на активността на плазмените трансаминази (AST и ALT), но техните стойности остават достоверно по-високи от тези на контролната група, което предполага, че за увреждането на хепатоцитите допринасят и други механизми. Подобни тенденции се наблюдават и в промените на други маркери на чернодробната дисфункция, като алкална фосфатазата (Bhagwat VR et al., 2007).

Протективният ефект на мелатонина срещу липидната пероксидация може да се обясни със способността му директно да неутрализира свободните радикали (OH⁻ и ONOO⁻) (Reither R et al., 2000; Korkmaz A et al., 2009), както и със способността му да

повишава синтеза на антиоксидантните ензими като GPx, глутатион-редуктаза (GR), които обезвреждат OH^\cdot и ONOO^\cdot и подобряват антиоксидантната защита в клетките (Rodriguez C et al., 2004). Мелатонинът има директно действие върху свободните радикали и индиректно повлиява синтеза на антиоксидантни ензими. За други антиоксиданти, действащи по този начин-директно и индиректно върху процесите на оксидативния стрес, не открихме данни в научната литература.

Освен това SH групи инактивират липидните хидропероксиди, което означава, че повишеното ниво на T-SH-групи след третирането с мелатонин вероятно представлява алтернативен метод за протекция срещу индуцираното от ТТ увреждане на черния дроб. Повишените нива на тиол-съдържащите съединения (глутатион) и повишената антиоксидантна защита при третирането с мелатонин ограничават оксидативното увреждане на черния дроб при ТТ.

За разлика от свободните радикали продуктът на липидната пероксидация - 4-хидроксиноненалът лесно дифузира и може да достигне далеч от мястото на образуването си (Pizzimenti S et al., 2013). Митохондриите и ендоплазменият ретикулум са особено чувствителни към увреждащото действие на 4-HNE (Chaple S et al., 2013). 4-HNE уврежда mtDNA, предизвиква митохондриална дисфункция и клетъчна смърт (апоптоза) (Chaudhary P et al., 2010; Dalleau S, 2013). 4-хидроксиноненалът е не само маркер на оксидативния стрес, но действа и като медиатор на оксидативното увреждане с модифициране на специфични клетъчни функции (Arashiki N et al., 2010).

Мелатонинът поради високо-липофилната си природа, може да достигне до всяка клетка и да инхибира увреждането на липидите и протеините в мембраните, както и на DNA в ядрото и митохондриите. За разлика от мелатонина, други антиоксиданти като витамин А и витамин Е, които са локализирани в клетъчната мембрана и витамин С, който се намира в цитозола, нямат тази способност (Reiter R et al., 2002). Мелатонинът ограничава оксидативните увреждания на черния дроб и при други експериментални модели с исхемия/реперфузия, с хепатотоксини като тетрахлорметан, алкохол, циклоспорин А (Mishra et al., 2011; Bruck et al., 2004; Wang et al., 2005; Jung et al., 2009). Съществуват убедителни данни за статистически значимия позитивен ефект на мелатонина при лечението на пациенти със сепсис и септичен шок и други патологични състояния с доказан повишен оксидативен стрес (Escames G et al., 2006). Доказано е, че приложеният мелатонин

намалява нивото на MDA-4-HNE, повишава антиоксидантната защита и продукцията на шаперони (HSP60), подобрява кръвотока и предпазва панкреаса от остро тъканно увреждане (Jaworek J et al., 2012).

Следователно, активирането на липидната пероксидация в черния дроб и намаляването на нивото на T-SH, както и модификацията на мембранните протеини от 4-HNE, участват в механизмите на оксидативното увреждане на черния дроб. Мелатонинът като директен и индиректен антиоксидант потиска токсичното действие на 4-HNE и ограничава ТТ-индуцираното оксидативно увреждане на черния дроб.

Доколкото ни е известно, проведеното от нас проучване е първото, при което степента на оксидативно увреждане се доказва чрез повишеното съдържание на 4-HNE в черния дроб при този модел. Предимство на имунохистохимичния метод е възможността да се установи степента и локализацията на увреждане на клетките. Резултатите от настоящото изследване показват повишена експресия на 4-HNE в СЕК и перипорталните хепатоцити, което е израз на оксидативното увреждане на черния дроб при ТТ- групата.

По-нови изследвания доказват, че ефектите на 4-HNE се дължат на модулирането на генната експресия посредством действието му върху вътреклетъчните сигнални каскади (Chaudhary P et al., 2010, Dalleau S et al., 2013; Pizzimenti S et al., 2013). Модифицирането на ядрените протеини, индуцирана от 4-HNE, както и промяната в редокс-статуса на хепатоцитите предизвикват активиране на транскрипционни фактори или регулаторни елементи (Chapple S et al., 2013).

4-хидроксиноненалът може да модулира широк спектър от процеси в клетката и редокс-чувствителни сигнални пътища, някои от които допринасят за адаптивните цитопротективни отговори, докато други стимулират увреждането на клетката и дори клетъчната смърт (Chen Z & Niki E 2006). Дали 4-HNE ще има основно цитотоксичен ефект и/или ще задейства определени сигнални механизми, зависи до голяма степен от баланса между образуването му и неговия клирънс. Глутатион S-трансферазите (GSTs), както е известно стимулират метаболизма на повечето клетъчни 4-HNE и регулират вътреклетъчните му концентрации (Awasthi YC et al., 2005).

Високите концентрации на 4-HNE и на други продукти на липидната пероксидация, които играят роля на токсични месенджери могат да задълбочат оксидативното увреждане (Franco Mdo C et al., 2002; Pizzimenti S et al., 2013). Поддържането на 4-HNE

в субтоксични или близки до физиологичните концентрации стимулира експресията на антиоксидантните ензими и адаптивните процеси (Niki E., 2009).

От получените в настоящото проучване резултати може да се заключи, че повишената продукция на свободни радикали и небалансираната антиоксидантна защита при ТТ допринася за оксидативното увреждане на черния дроб, доказано чрез повишаване тъканното ниво на МДА и HNE. Мелатонинът като директен и индиректен антиоксидант и мембрано-стабилизатор потиска индуцираното от оксидативния стрес увреждане на черния дроб. Мелатонинът намалява нивото на 4-HNE и повишава нивото на T-SH и вероятно възстановява редокс-баланса в клетките на черния дроб. Твърде възможно е мелатонинът чрез този механизъм да модулира редокс-чувствителните сигнални пътища като потиска образуването на про- възпалителни медиатори и стимулира редокс-чувствителни сигнални пътища, допринасящи за повишаването на антиоксидантната защита.

4.2. Определяне нивото на експресия на транскрипционния фактор NF- κ B и на някои про-и анти-възпалителни цитокини в черния дроб и плазмата при термична травма и ролята на мелатонина във възпалителния процес

Термичната травма индуцира локален и системен възпалителен отговор и увреждания на органите, отдалечени от мястото на термичното поражение включително и на черния дроб (Cuzzocrea S et al., 2001; Ulrich D et al., 2001, Sakarcan A et al, 2002; Agay D et al, 2008; Iseri SO et al.,2008; Dahiya P, 2009; Williams FN et al., 2009).

NF- κ B е ключов транскрипционен фактор, повишаващ експресията на гените на про-възпалителните цитокини (TNF α , IL-1, IL-6) и медира увреждането на органите при системен инфламаторния отговор (Pantano C et al., 2006; Trachootham D et al., 2008; Siomek A et al., 2012). Мелатонинът притежава анти-възпалително и антиоксидантно действие (Maldonado M et al., 2007; Pohanka M, 2013; Mauriz JL et al., 2013) и се предполага, че потискайки възпалителния отговор може да предотврати чернодробната дисфункция при ТТ. За тестване на тази хипотеза изследвахме експресията на транскрипционния фактор NF- κ B и нивото на някои про-инфламаторните (TNF α и IL-6) и анти-инфламаторни (IL-10) медиатори в черния дроб при ТТ и след прилагане на мелатонин.

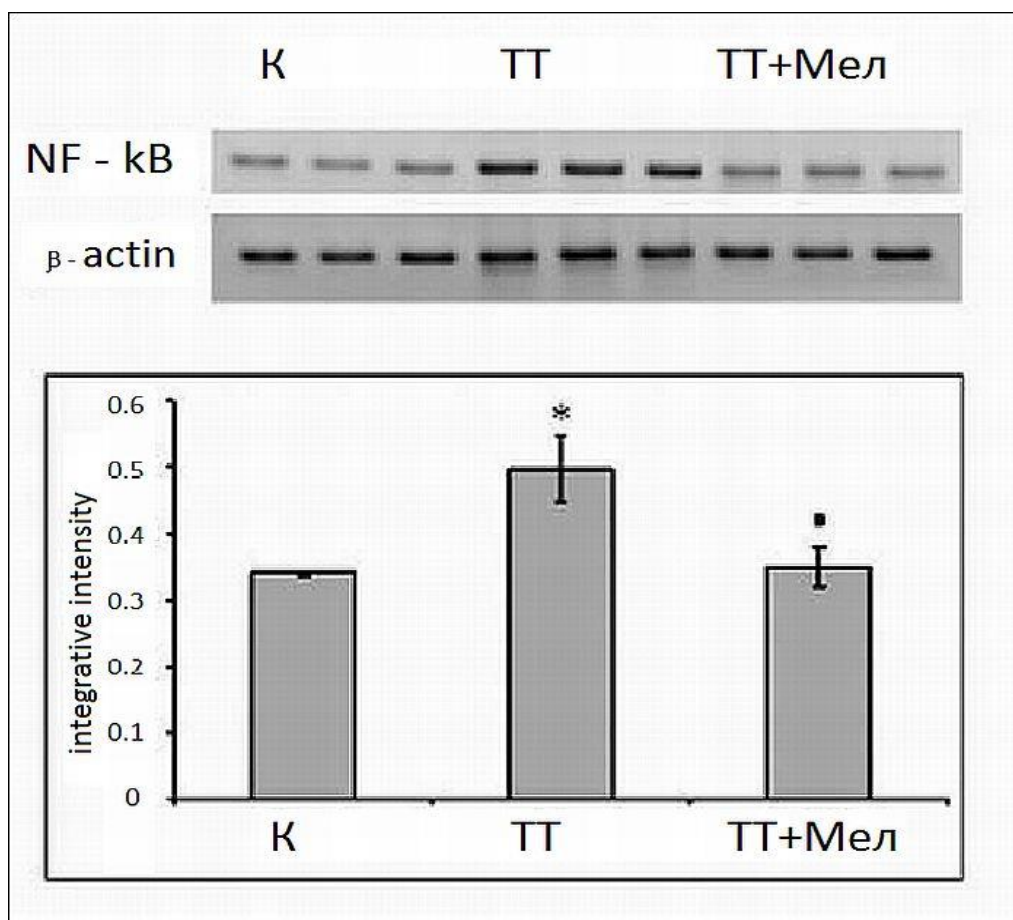
4.2.1. Експресия на транскрипционния фактор NF-κB

Резултатите от Western blotting изследването на транскрипционния фактор NF-κB в чернодробен хомогенат са представени на фиг.-2.1. Експресията на NF- κB се повишава с 48% ($p < 0.05$) в ТТ-група спрямо тази в контролната група. Третирането с мелатонин понижава достоверно повишената експресия на NF-κB и тя е близка до тази в контролната група на 24 ч след ТТ.

4.2.2. Определяне нивото на про- и анти-възпалителните цитокини в чернодробен хомогенат и плазма

Промени в нивото на про-инфламаторните медиатори TNFα и IL-6 в чернодробен хомогенат са показани на фиг.2.2.2 и фиг.2.2.3. Установено е повишаване на TNFα ниво с 112 % ($p < 0.05$), а на IL-6 с 134% ($p < 0.05$) в чернодробен хомогенат от ТТ групата в сравнение с това в контролната група. При третиране с мелатонин концентрацията на TNFα в черния дроб намалява с 69% ($p < 0.05$), а това на IL-6 с 60 % ($p < 0.05$) до недостоверни различия от нормата.

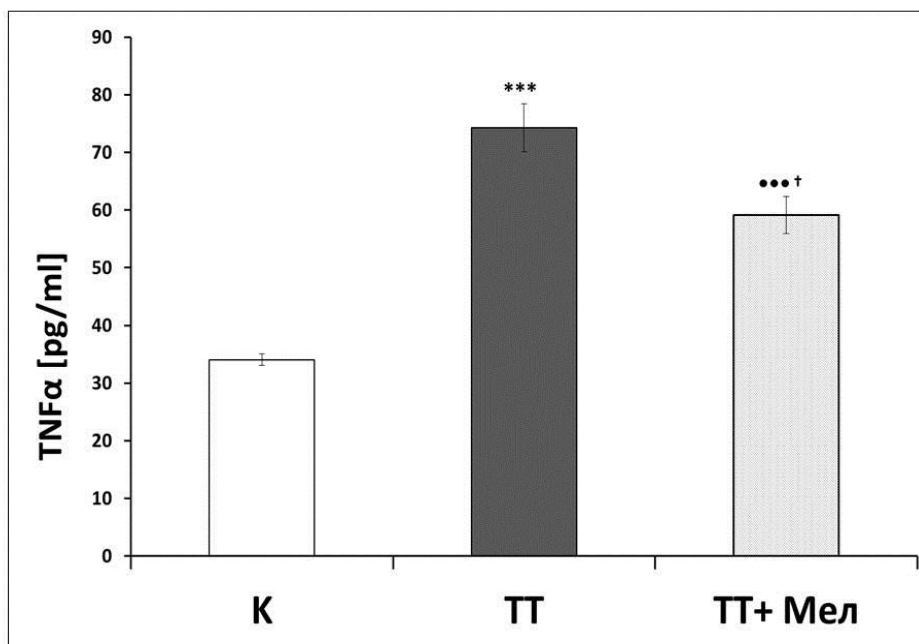
Нивото на анти-възпалителния цитокин IL-10 в чернодробен хомогенат не се променя достоверно в ТТ група спрямо това на контролната група (фиг 2.4). Мелатонинът повишава нивото на IL-10 в хомогенат от черен дроб с 44% ($p < 0.01$) спрямо това на ТТ група, и то е достоверно по-високо от тази в контролната група.



Фигура 2.1. Western blotting анализ на транскрипционната активност на NF-kB в черен дроб в K-контроли , TT –термична травма TT+мелатонин.

Данните показват повишаване на експресията на NF-kB на 24 ч след TT, а приложеният мелатонин (2x10 mg/kg) инхибира това повишение. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност.

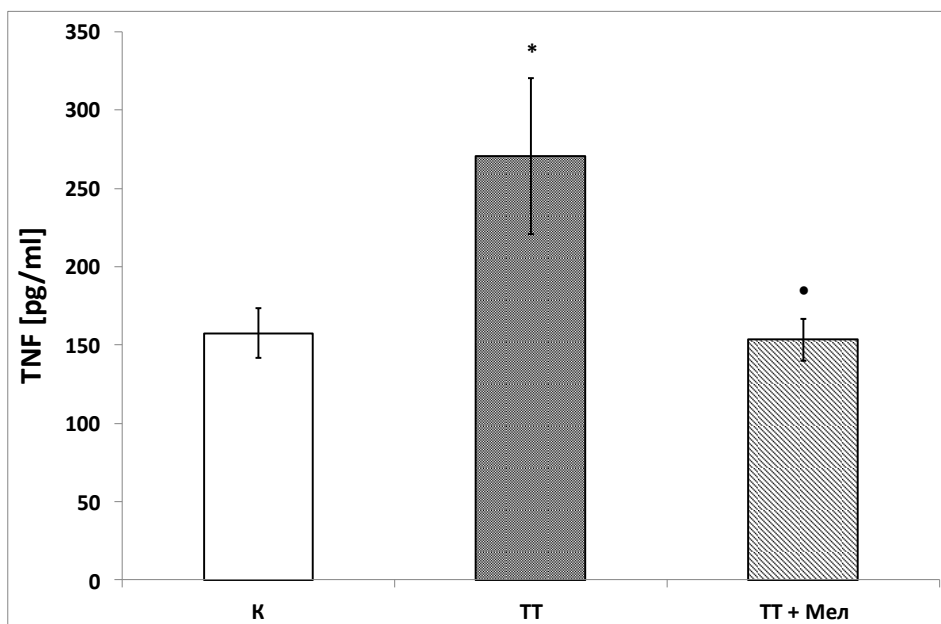
* $p < 0.05$ спрямо контролната група; $o < 0.05$ TT групата



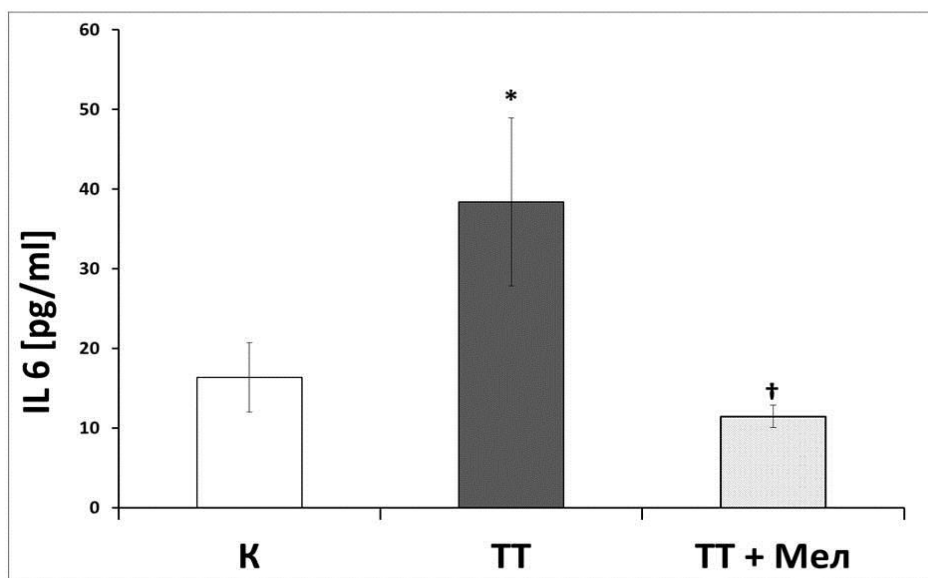
Фигура 2.2.1. Ефект на мелатонина върху ниво на TNF- α в плазмата. К-контроли (n= 8), TT –термична травма (n=8) TT+мелатонин (n=8). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** $p < 0.05$ спрямо К група групата; $p < 0.05$ спрямо TT група;+ $p < 0.05$ спрямо К групата.

4.2.3. Връзка между степента на оксидативно увреждане и възпаление в черния дроб

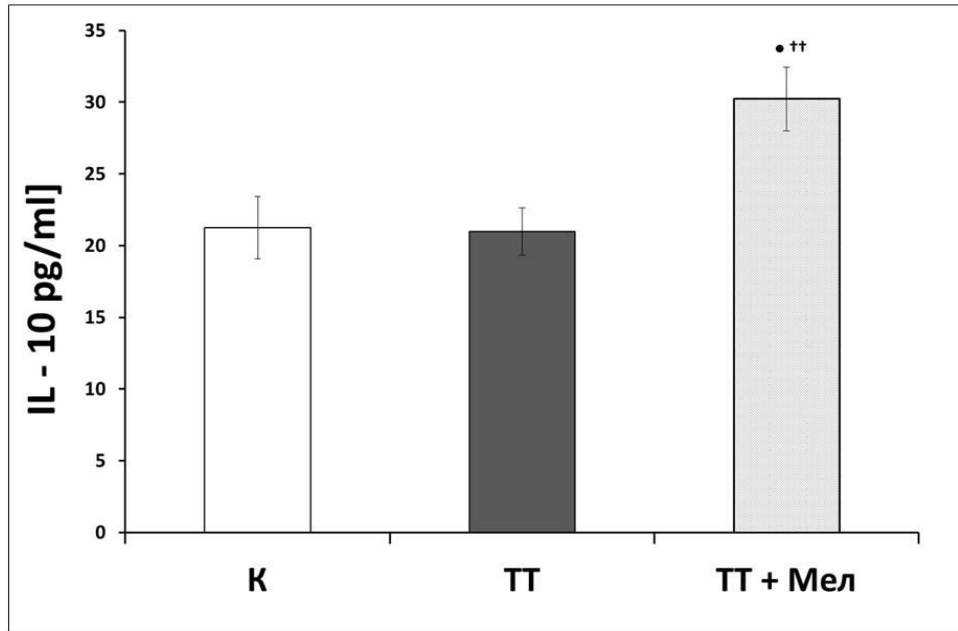
Данните показват наличието на силна положителна корелационна връзка между нивото на MDA и на TNF α в черния дроб при животните с TT ($r = 0.50$, $p < 0.05$).



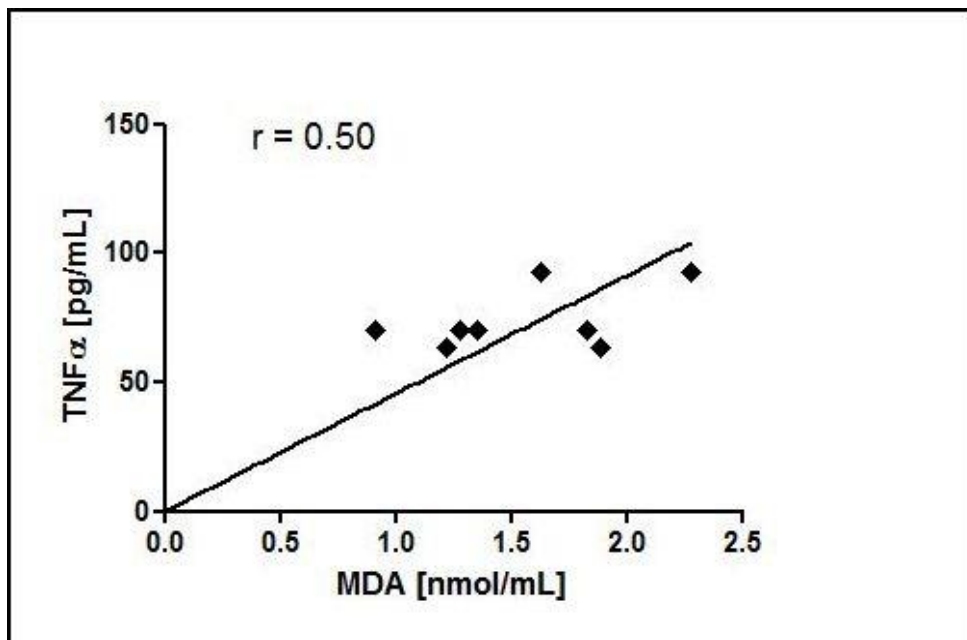
Фигура 2.2.2. Ефект на мелатонина върху нивото на TNF- α в чернодробен хомогенат при ТТ. К-контроли ($n=8$), ТТ –термична травма ($n=8$); ТТ+мелатонин ($n=8$). Данните са представени като средна стойност + средна грешка на средната стойност. * $p<0.05$ спрямо стойностите на контролната група; † $p<0.05$ спрямо стойностите на ТТ група;



Фигура 2.2.3. Ефект на мелатонина върху концентрацията на IL-6 в чернодробен хомогенат. Групи: К-контроли ($n=8$), ТТ –термична травма ($n=8$) ТТ+мелатонин ($n=8$). Данните са представени като средна стойност + средна грешка на средната стойност; * $p<0.05$ спрямо стойностите на контролната група; † $p<0.05$ спрямо стойностите на ТТ групата.



Фигура 2.2.4. Ефект на мелатонина върху нивото на IL-10 в черния дроб при термична травма. Групи: К-контроли (n= 8) , ТТ –термична травма (n=8) ТТ+мелатонин (n=8). Данните са представени като средна стойност + средна грешка на средната стойност. $p < 0.01$ спрямо нивото на ТТ-група; $^{††} p < 0.001$ спрямо контролната група.



Фигура 2.3. Корелационна зависимост между TNFα и MDA в черния дроб при термична травма

4.2.4. Обсъждане

Свободните радикали са едни от основните активатори на редокс-чувствителните транскрипционни фактори, включително и на нуклеарния фактор каппа В (NF-kB). (D'Angio et al, 2000; Gloire G et al, 2006; Yuan L & Kaplowitz N, 2009). NF-kB е ключов транскрипционен фактор, който повишава експресията на гените на про-възпалителните цитокини като IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , на хемокините (IL-8), на адхезионните молекули (VCAM-1 и ICAM-1), на iNOS и CRP (Verma S et al, 2003; Pantano C et al., 2006; Trachootham D et al., 2008; Luedde T & Schwabe RF, 2011; Morgan MJ & Liu ZG, 2011 Siomek A et al., 2012). Резултатите от настоящото изследване показват повишена експресия на NF-kB и ниво на про-възпалителните медиатори TNF α и IL-6, CRP в плазмата и в черния дроб, а мелатонинът предотвратява това повишаване при ТТ.

Термичната травма предизвиква локално увреждане на тъканите и акумулиране на токсични продукти от тъканния метаболизъм (липидни пероксиди), освобождаване на цитокини от активираните макрофаги, които попадаяки в кръвотока могат да предизвикват системен възпалителен отговор (Gauglitz GG et al., 2008; Rani M & Schwacha MG, 2012).

Повишаването на нивото на TNF α , IL-6 и IL-1 β в циркулацията е свързано с локалното и системно възпаление и показва ролята на тези цитокини в ранния възпалителен отговор при ТТ. Смята се, че възпалителните медиатори преминали от кръвта в черния дроб предизвикват възпалителна реакция. От друга страна самите чернодробни клетки образуват молекулни маркери на възпалението. Във възпалителните процеси в черния дроб участват активираните Купферови клетки и други възпалителни клетки, които секретират про-възпалителни цитокини и острофазови протеини (Ramadori G et al., 2008).

TNF α е от „първата линия“ про-възпалителни цитокини и има съществена роля в отключването и предаването на възпалителния отговор (Jeschke MG et al., 2001, 2002; Sener G et al, 2006; Chen LW et al., 2007). Доказано е, че TNF α повишава експресията на IL-6 и IL-1 β , както и на други медиатори като iNOS/NO, участващи в възпалителния отговор и в увреждането на ендотелните клетки и хепатоцитите при травма (Chandrsekharan et al., 2007; Zelová H & Hošek J, 2013). IL-6 е мощен плеотропен про-възпалителен цитокин и играе ключова роля в продукцията на остро-фазови протеини. Доказано е, че IL-6 потиска апоптозата на левкоцитите, продуциращи супероксидни радикали (Biffi WL & Moree EE 1996).

TNF- α повишава продукцията на ROS и други цитокини като IL-6 и IL-1 от неутрофилите (priming response) още в първите часове след ТТ (Chen LW et al., 2006).

Оказва се, че оксидативният стрес играе важна роля в първичната клетъчна и тъканна деструкция, а така и във вторичната възпалителна реакция. ROS/RNS могат да активират транскрипционния фактор NF- κ B и да повишават експресията на про-възпалителните цитокини TNF α и IL-6, които имат цитотоксично действие и могат да предизвикват чернодробно увреждане. От друга страна, увеличената продукция на TNF α и IL-6 и свободни радикали повишава експресията на транскрипционния фактор NF- κ B. Вероятно по този начин се формира порочен кръг между оксидативния стрес и възпалителните процеси чрез активирането на NF- κ B. В подкрепа на тези представи е намерената в настоящата работа корелационна зависимост между нивата на TNF α и MDA в черния дроб при ТТ ($r=0.50$, $p < 0.05$) (фиг.2.3). Подобна зависимост между маркерите на липидната пероксидация и възпалителните процеси в черния дроб е установена при клинични изследвания и други експериментални модели на ТТ (Sener G et al., 2005; Chen XL et al., 2006).

Резултатите от настоящото проучване показват, че нивото на про-възпалителните медиатори TNF α , IL-6 се повишава значително, докато това на IL-10, притежаващ анти-инфламаторните свойства, не се променя (фиг. 2.4). Други автори установяват дори намаляване нивото на анти-инфламаторните цитокини, включително и на IL-10 в черния дроб след ТТ (Wang ZT et al., 2004; Mendoza AE et al., 2012). Основната роля на IL-10 е да потиска продукцията на про-инфламаторните медиатори (TNF α и IL-6) и да участва в регулирането на инфламаторния отговор (Schneider CP et al., 2004). Възможно е анти-възпалителното действие на IL-10 да се осъществява чрез инхибиране на NF- κ B или по други все още неизяснени механизми (Bosschaerts T et al., 2011).

Представените резултати позволяват да се направи извода, че дибалансът между про-и анти-възпалителни цитокини с превалиране на про-възпалителните медиатори при оксидативен стрес е един от основните механизми за увреждане на клетките (непаренхимни и паренхимни) в черния дроб. В подкрепа на това твърдение е промяната на биохимичните маркери, като повишаване активност на трансаминазите (AST и ALT) на холинестеразата (ChE) и на гама-глутамил трансферазата (GGT) в плазмата, както и хистопатологичните промени в черния дроб при активиране на възпалителните процеси при ТТ. Резултатите от настоящото

изследване са в съответствие с данни за дисбаланс между повишеното ниво на про-възпалителните и ниското ниво на анти-възпалителните цитокини, един от основните патофизиологични механизми при остър панкреатит (Jaworek J et al., 2012). Затова, според нас много по-информативно при изследване ролята на възпалението в механизмите на тъканното увреждане е да се отчита промяната в про-анти-инфламаторния баланс, отколкото само промяната на отделни про-инфламаторни медиатори.

Клиничните проучвания показват, че персистиращият възпалителен отговор повишава чувствителността към инфекции и сепсис, което може да предизвика полиорганна недостатъчност на пострадали от ТТ (Finnerty CC et al., 2009). Данни от литературата показват, че инхибирането на възпалителен отговор чрез прилагане на антиоксиданти като токоферол, N-ацетилцистеин и инсулин ограничава увреждането на черния дроб, миокарда и подобрява функционалната активност на тези органи при ТТ (Jeschke MG, 2002a; Horton JW, 2003; Csontos C et al., 2012).

Мелатонинът потиска експресията на NF- κ B, намалява нивото на TNF α и IL-6 в черния дроб, както и плазмената активност на чернодробните ензими, като тя остава доста по-високо от нормата, което предполага участието и на други патофизиологични механизми на тъканното увреждане на черния дроб. Паралелно с това, мелатонинът повишава продукцията на IL-10, притежаващ анти-възпалителен ефект. Възможно е, мелатонинът и IL-10 да имат едноредно редуциращо действие върху нивата на TNF α и IL-6 в черния дроб. Мелатонинът модулира баланса между про- и анти-възпалителните цитокини и при патологични състояния (Kireev RA, 2012; Wu WS, 2012, Oliveira LG, 2013). Нашите данни показват, че мелатонинът корегира дисбаланса между про- и анти-възпалителните цитокини и вероятно това е един от механизмите за протекция на черния дроб при ТТ.

NF- κ B е ключов оксидант-чувствителен транскрипционен фактор, стимулиращ експресията на гените не само на про-възпалителните медиатори, но и на протективни антиоксидантни и стрес-индуцирани гени, които са свързани с оцеляването на клетките (Baeuerle PA & Baltimore D. 1996; Mauriz et al., 2013; Chen LW et al, 2007; Sun BW et al., 2008; Yang Q et al, 2011). Проучването на влиянието на мелатонина върху експресията на NF- κ B и ролята му в механизмите на увреждане на черния дроб е важно с оглед изследване на нови средства за ограничаване на възпалителния отговор и чернодробната дисфункция при ТТ.

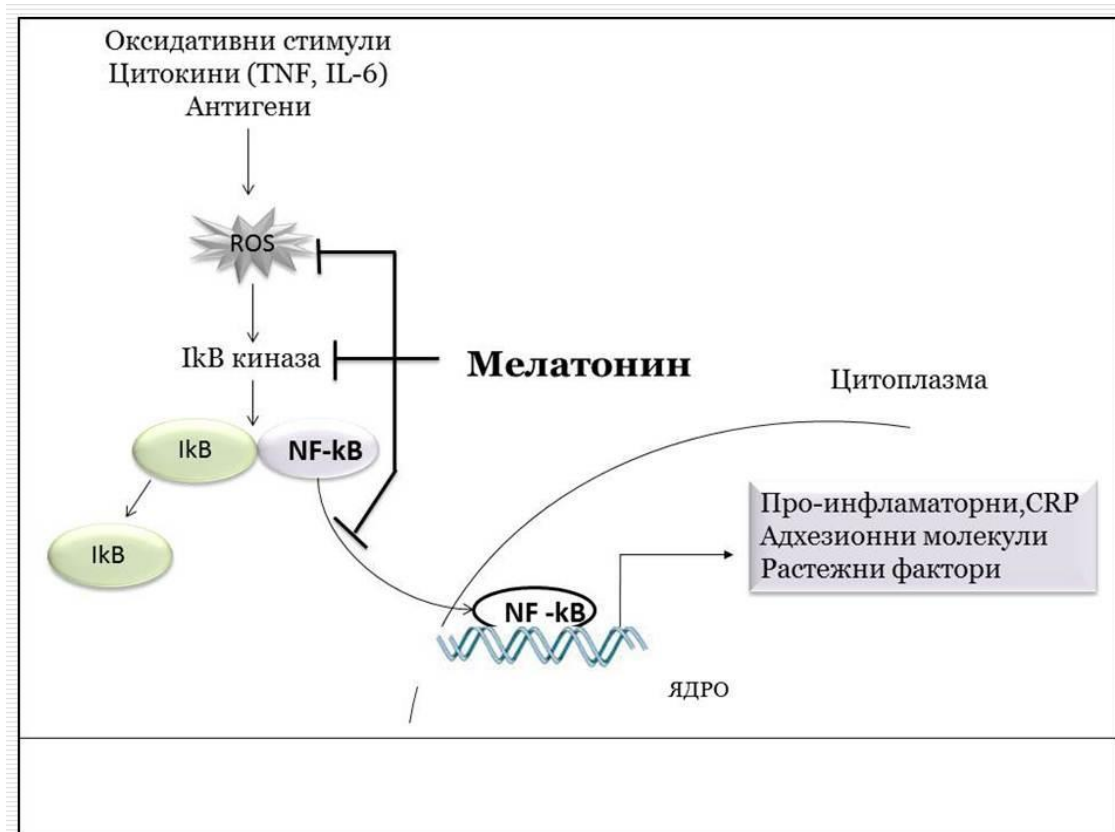
Мелатонинът притежава антиоксидантни свойства и способност да улавя свободните радикали, както и да ограничава тяхното увреждащо действие върху макромолекулите в чернодробната тъкан (Sener G et al, 2002) и в други органи при ТТ (Al-Ghoul et al., 2010). Способността на мелатонина да ограничава увреждането на черния дроб се свързва и с анти-възпалителните му свойства (Reiter R et al., 2000; Mauriz JL et al, 2013). Мелатонинът потиска активирането на NF- κ B, понижава продукцията на про-възпалителните цитокини, както и високореактивните радикали (OH-ONO $_2$ - и HOCL) и тяхното токсично действие върху клетките (Cuzzocrea S et al., 2001, Reiter R, 2000; Hu S et al., 2009; Hernández JL et al., 2011; Choi YK et al., 2012; Kokzmaz A et al., 2012).

Може да се да предположи, че мелатонинът ограничава възпалителните процеси и увреждането на черния дроб при ТТ и по друг начин. Мелатонинът предотвратява транслокацията NF- κ B към ядрото и прикрепянето му към DNA (Li JH et al., 2008) и вероятно по този начин намалява експресията и нивото на про-възпалителните медиатори като TNF α и IL-6 в черния дроб (Фиг.3.6).

Освен това мелатонинът потиска експресията и синтеза на други про-възпалителни интерлевкини (IL-1 β), простагландини и адхезионни молекули (ICAM-1, VCAM-1) и повлиява трансендотелната миграция на левкоцитите и отока, които съпътстват тъканно увреждане при ТТ (Li JY et al., 2008; Maldonado M et al., 2007; Pohanka M, 2013; Mauriz JL et al., 2013).

Повишената продукция на IL-6 от активираните възпалителни клетки стимулира продукцията на CRP от черния дроб. Ние установяваме високи нива на остро-фазовия протеин CRP като индикатор за системно възпаление, което е в съответствие с установеното от други автори при ТТ (Ulrich, D et al., 2001; Dehne, MG et al., 2002; Avlan D, 2005; Vinha PP et al., 2013).

CRP се синтезира в черния дроб, но данни от литературата показват, че той се секретира и от инфламаторните клетки (Haider DG et al., 2006). Освен това, CRP повишава продукцията на про-инфламаторните цитокини и адхезионните молекули (Devaraj S et al., 2006). Може да се предположи, че повишената продукция на CRP от хепатоцитите и от активираните левкоцити, засилва дисбаланса между про- и анти-възпалителните процеси и стимулира възпалителните процеси предизвикващи увреждане на черния дроб. За пръв път е установено, че мелатонинът ограничава повишаването на плазменото ниво на CRP, което вероятно е свързано с потискане експресията на транскрипционния фактор NF- κ B.



Фигура 3.6. Схематично представяне на инхибиращото действие на мелатонина върху NF-κB медиация инфламаторен отговор при термична травма. Мелатонинът неутрализира ROS и RNS и потиска активирането на NF-κB, освен това може да предотврати транслокацията на NF-κB към ядрото и да намали експресията на про-инфламаторни медиатори като TNFα и IL-6 и тяхната цитотоксичност.

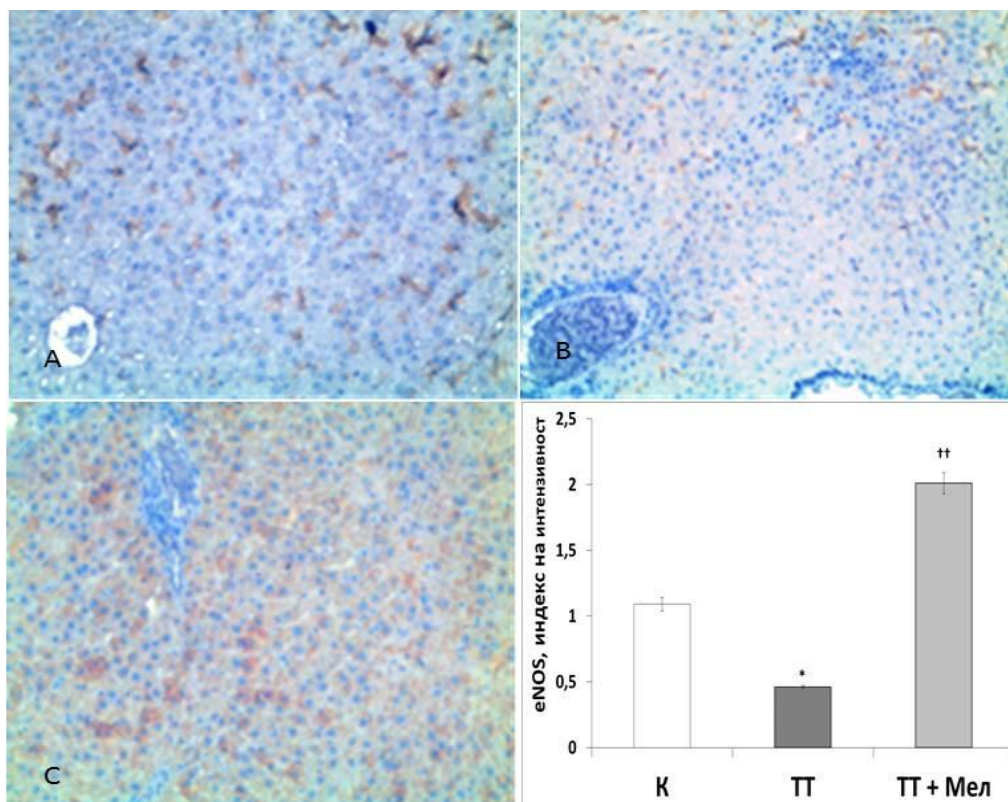
От получените при настоящото изследване резултати може да се заключи, че дисбалансът между про- и анти-възпалителните медиатори е един от възможните патофизиологични механизми за чернодробното увреждане при ТТ. Мелатонинът намалява нивото на про- възпалителните и повишава на анти- възпалителните цитокини, възстановява баланса между тях, подобрява чернодробната функция и корегира структурните промени след ТТ. Мелатонинът протектира срещу увреждането на черния дроб и този ефект най-вероятно е свързан с потискане на медиацията от транскрипционния фактор NF-κB възпалителен отговор в острия период след термична травма.

4.3. Изследване на ендотелната NO-синтаза и на други маркери на ендотелната и микроциркулаторна дисфункция в черния дроб, индуцирани от термична травма и повлияването им от мелатонина

Ендотелът е основна мишена за действието на възпалителни медиатори като свободни радикали, цитокини и остро-фазни белтъци. Свободните радикали във физиологични концентрации участват в поддържане на съдовия интегритет. Свръхпродукцията на ROS и липидните пероксиди допринася за развитието на ендотелна и микроциркулаторна дисфункция, които представляват сериозен проблем при патологични състояния в клиниката като термична травма, сепсис и исхемия/реперфузия (Kumar P et al., 2009; Shen Q et al., 2009). Други фактори, които увреждат ендотела са системното съдово възпаление, симпатиковата хиперактивност, повишените нива на глюкозата и липидите в кръвта при ТТ (Huet O et al., 2011). Ендотелната дисфункция е резултат от намалената NO-бионаличност, повишената експресия на про-възпалителни медиатори и про-тромбогенни фактори. Промените във функционалната активност на кръвните клетки и ендотелната дисфункция предизвикват нарушения в микроциркулацията (Goertz O et al., 2011). Всички тези процеси в различни етапи от термичната травма биха допринесли за увреждане на структурата и функцията на черния дроб при ТТ.

4.3.1. Експресия на ендотелната NO- синтаза (eNOS)

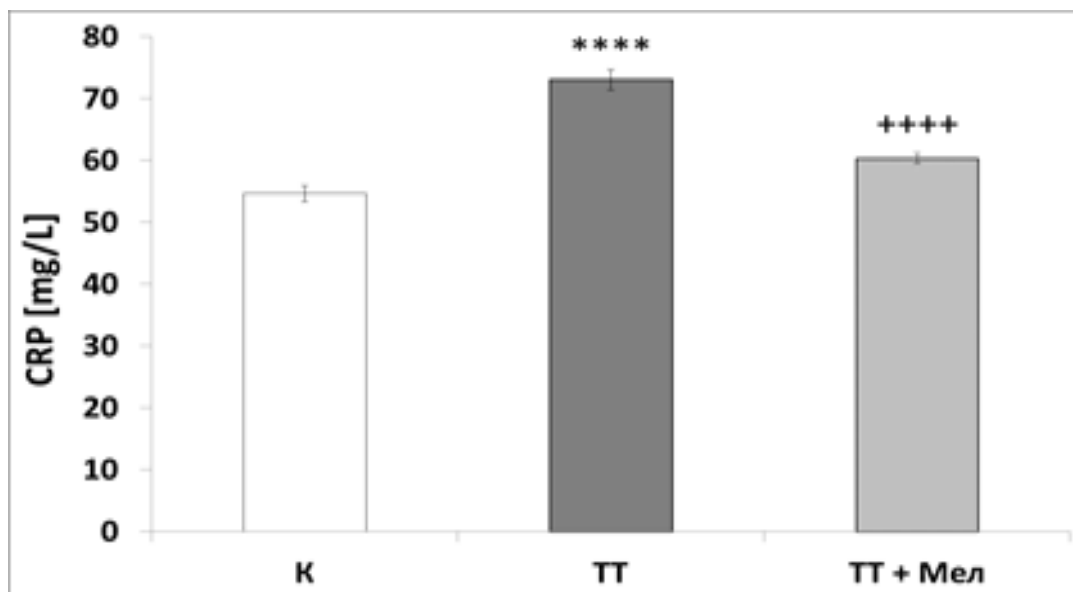
Имунохистохимичното изследване показва слаба експресия на ензима eNOS в CEK в Sham (контролната) група като средното съдържание на протеина в тези клетки е 1.09 ± 0.05 . По-голяма част от CEK са eNOS негативни в групата ТТ (фиг 3.1, А). eNOS-позитивна реакция се установява в някои CEK и в част от хепатоцитите в ТТ- групата. Средното съдържание на eNOS протеин в черния дроб е 0.46 ± 0.11 и е по-ниско спрямо това в контролната група (94%, ($p < 0.05$)) (фиг.3.1, В). Мелатонинът предотвратява редуцирането на eNOS в CEK и хепатоцитите след ТТ. Интензивността на реакцията варира от умерена до силна. Средното съдържание на eNOS протеин в черния дроб е $.2.01 \pm 0.08$ в ТТ+ Мел групата (фиг. 3.1, С).



Фигура 3.1. Имунохистохимичен анализ на ендотелната NO-синтаза (eNOS) в черен дроб в контролна група (А), с ТТ групата (В) и ТТ+Мел в групата (С). Интензивността на имунната реакция силно намалява в СЕК на черния дроб на 24 ч след ТТ. След прилагане на мелатонин съдържанието на eNOS протеин се повишава в групата ТТ+Мел и надвишава достоверно това на контролната група. Данните са представени като средна стойност + средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ към контролната група; ** $p < 0.01$ към ТТ групата.

4.3.2. С-реактивният протеин - индикатор на ендотелната дисфункция

Плазмената концентрация на CRP се повишава с 33% ($p < 0.001$) в групата с ТТ спрямо тази на контролната група. Мелатонинът намалява достоверно повишеното ниво CRP с 21 % ($p < 0.001$), и то почти достига това в контролните животни. В интактните животни третирани с мелатонин не са намерени достоверни различия спрямо тези на контролите (табл.1).



Фигура 3.2. Ефект на мелатонина върху нивото на С-реактивния протеин в плазма при термична травма. Групи: К-контроли (n= 8), ТТ–термична травма (n=8) ТТ+мелатонин (n=8). Данните са представени като средна стойност + средна грешка на средната стойност ****. $p < 0.001$ спрямо нивото на ТТ-група; +++++ $p < 0.001$ спрямо нивото на контролната група.

4.3.3. Корелационна зависимост между нивото на С-реактивния протеин и малондиалдехид

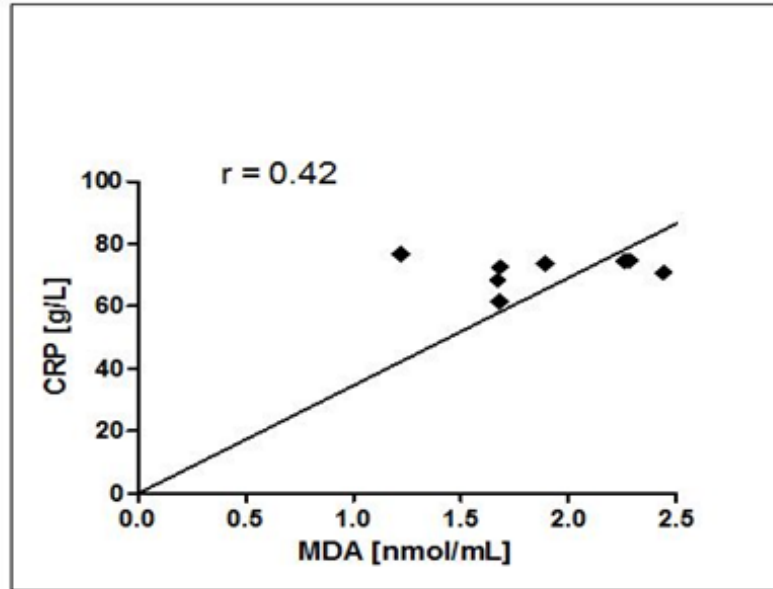
Резултатите от изследването показват наличие на положителна корелационна зависимост между MDA и CRP в плазмата при ТТ ($r = 0.42$) (фиг 3.3.)

4.3.4. Показатели за тромборезистентност на ендотела

За определяне на тромборезистентността на ендотела се използва коагулационен тест, включващ протромбинова активност (РА) и активирано парциално тромбoplastиново време (аРТТ), брой тромбоцити, морфология на тромбоцитите и ниво фибриноген.

4.3.4.1. Протромбинова активност, активирано парциално тромбoplastиново време

Протромбиновата активност (РА) в плазмата се повишава с 37%, ($p < 0.01$) в групата ТТ, спрямо тази на контролната група (Таблица 3.4.1). РА сигнификантно намалява в групата ТТ+Мел и достига контролните стойности на 24 час след ТТ.



Фигура. 3.3 Корелационна зависимост между MDA и CRP в плазмата

Активирано парциално тромбoplastиново време (aPTT) се удължава несигнификантно на 24 час сред ТТ. Слабо повишаване на aPTT се регистрира в групата ТТ+Мел. В контролните животни третирани с мелатонин нивата на PA и aPTT са близки до тези на контролните нетретирани животни.

Таблица 3.4.1. Ефект на мелатонина върху протромбинова активност (PA), активирано парциално тромбoplastиново време (aPTT)

Групи	PA (%)	aPTT (s)	Брой тромбоцити ($10^9/L$)
Контроли	39, 50 \pm 4, 91	18, 09 \pm 1, 01	630 \pm 59
Mel	41, 21 \pm 3,50	19,12 \pm 1, 43	622 \pm 42
ТТ	54, 11 \pm 4, 66**	20, 94 \pm 3, 49	690 \pm 34
ТТ+Mel	35, 44 \pm 5, 44 **	24, 65 \pm 1, 89	655 \pm 61

Легенда: Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. Контроли (n=10); Мел- третирани с мелатон контроли (n=10; ТТ- животни с термична травма (n=10); ТТ + Мел група -ТТ+ мелатонин (n=10). **p< 0.01 спрямо контролата; ++ p< 0.01 спрямо ТТ група;

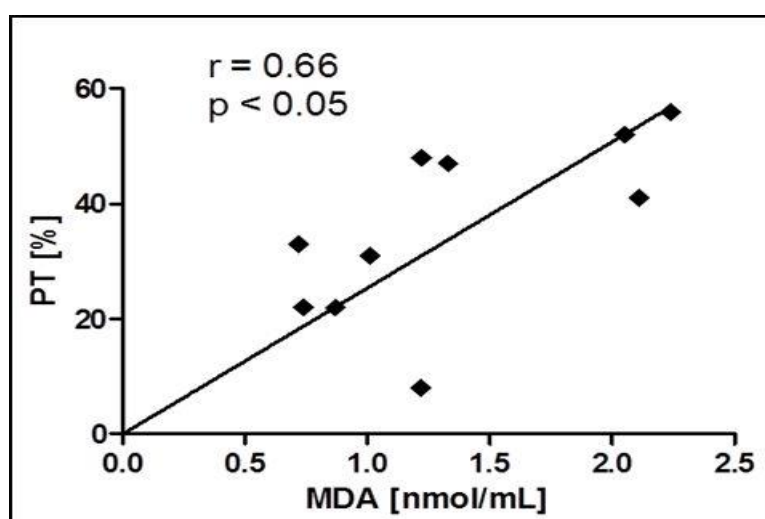
Таблица 3.4.2. Ефект на мелатонина върху нивото на малондиалдехид, С-реактивен протеин и фибриноген при ТТ

Групи	Малондиалдехид (ηmol/mL)	С-реактивен протеин (g/L)	Фибриноген (g/L)
Контроли	1,46 + 0,085	54,63 + 1,25	0,95 + 0,13
Mel	1,42+ 0,091	53,85+ 0,99	1,03+ 0,21
ТТ	2,03 + 0,14***	73,05 + 1,64 ***	3,99 + 0,41***
ТТ+Mel	1,35 + 0,18**	60,35 + 0,81***	2,75 +0,27***

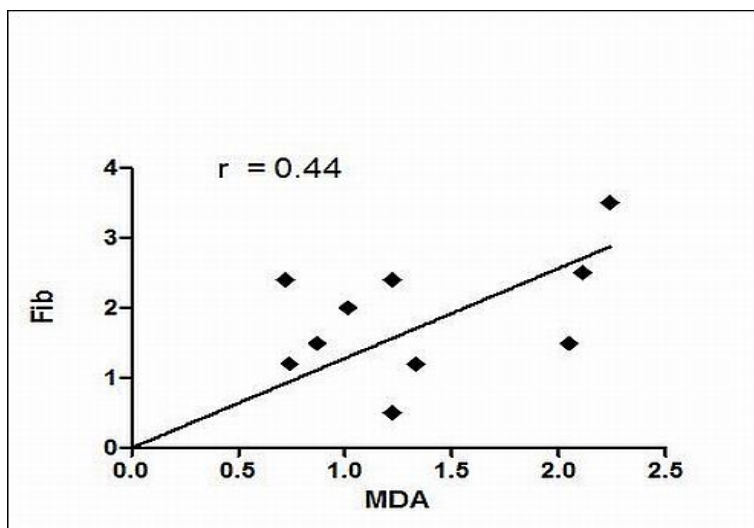
Легенда: Данните са представени като средна стойност+средна грешка насредната стойност. *** $p < 0.001$ спрямо К- група; *** $p < 0.001$ спрямо ТТ група; ** $P < 0,01$ спрямо ТТ група;

4.3.4.2. Връзка между степента на оксидативно увреждане и хиперкоагулацията при ТТ

Резултатите показват средно висока корелационна зависимост ($r=0.66$, $p < 0.001$) между РА и плазмения MDA при ТТ (фиг.3.4.2.2). Умерена корелационна зависимост се установява между повишените плазмени нива на фибриноген и MDA ($r = 0.44$) (фиг.3.4.2.3).



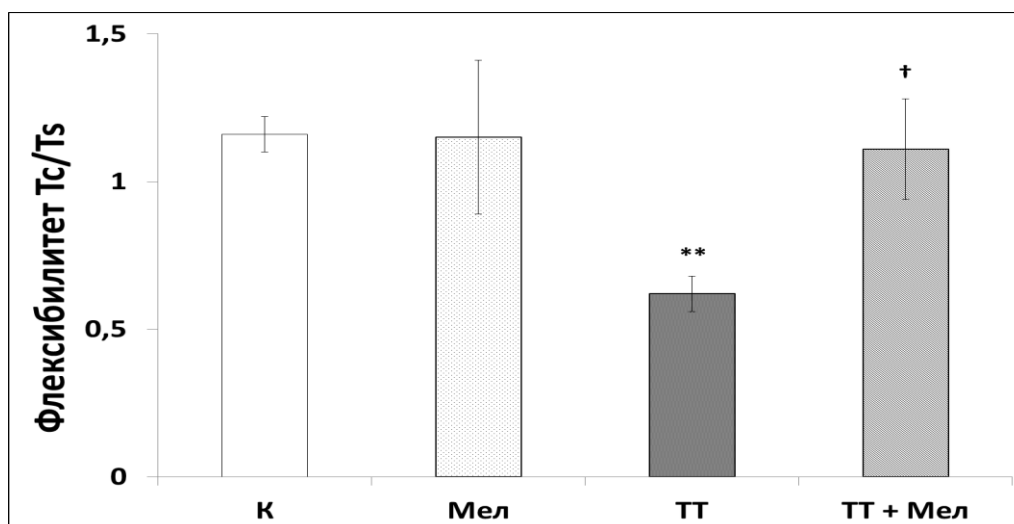
Фигура 3.4.2.2. Корелационна зависимост между нивото на протромбиновото време и малондиалдехид в плазмата при ТТ.



Фигура. 3.4.2.3. Корелационна зависимост между нивото на малондиалдехида и фибриногена в плазмата при ТТ

4.3.5. Влияние на мелатонина върху флексибилитета на еритроцитите

Резултатите от нашите изследвания показват, че флексибилитетът на еритроцитите намалява с 39 % ($p < 0.01$) на 24 ч след ТТ. Мелатонинът ограничава достоверно намаления флексибилитет на еритроцитите с ($p < 0.05$) след ТТ (фиг.3.5). Не са установени статистически значими различия между контролната група и третираната с мелатонин група здрави животни.



Фигура 3.5 Ефект на мелатонина върху флексибилитета на еритроцитите (T_s/T_c) при ТТ. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; + $p < 0.05$ спрямо ТТ група.

4.3.6. Обсъждане

4.3.6.1. Ефект на мелатонина върху експресията на ендотелната NO-синтаза

Ендотелната NO-синтаза (eNOS) е един от важните вазорегулаторни ензими и е тясно свързан с ендотелната и микроциркулаторна дисфункция. Активността на eNOS намалява при различни модели на хепатална дисфункция и се възстановява под действие на екзогенно приложен мелатонин (Park SW et al., 2007). За първи път е установена връзка между хепатопротективният ефект на мелатонина, експресията на eNOS и ограничаване на ендотелната дисфункция при модел на ТТ (фиг.3.1).

В черния дроб се синтезират поне две различни изоформи на NOS: конститутивната/ендотелна (eNOS) и индуцируема изоформа (iNOS). eNOS е постоянно експресирана. NO/eNOS се генерира в малки количества, има вазодилатиращо действие, потиска адхезията на левкоцитите към съдовата стена, агрегацията на тромбоцитите, апоптозата на ендотелните клетки и има протективен ефект (Glemens MG et al., 1999; Rawlingson A, 2003; Mauriz JL et al., 2013). NO/iNOS се освобождава от възпалителните клетки, повишава продукцията на пероксинитрит (ONOO-, формиран от NO и O₂⁻), който е цитотоксичен и стимулира съдовото възпаление, липидната пероксидация в митохондриите, апоптозата на CEK (Luo G et al., 2005; Diesen et al., 2010) и увреждането на черния дроб. Пероксинитритът предизвиква не само увреждането на DNA, но и инхибира възстановяването на DNA и особено на mtDNA (Chen JH et al., 2004).

Докато eNOS има протективен ефект върху микроциркулацията в черния дроб, повишената експресия на iNOS стимулира локалното възпаление, нарушенията в микроциркулацията и тъканното увреждане (Szabó C, 1994; Schwacha MG, 1998; Pullamsetti SS et al., 2006). Базалната продукция на NO от eNOS, както е известно, инхибира активирането на транскрипционния фактор NF-κB и протеин киназа (PKC) (Serracino-Inglott F et al., 2002). Възможен механизъм за намаляване на eNOS активност е активирането на транскрипционния фактор NF-κB, който повишава експресията на ендотелин-1 (ET-1) и на други про-възпалителни медиатори като TNFα, IL-6, iNOS, ROS/RNS, хемокини (IL-8) и адхезионни молекули (ICAM-1, ELAM-1) (Hines IN & Grisham, 2011;

Mauriz JL et al., 2013), допринасящи за развитието на ендотелната дисфункция при ТТ.

Мелатонинът намалява експресията на NF- κ B и медираната от него продукция на цитокини и свободни радикали, за които е доказано, че инхибират директно експресията на eNOS в съдовете (Neumann P et al., 2004). Данните от нашите изследвания са в съответствие с резултатите на други автори, показващи намалена eNOS активност в CEK в условията на исхемия/реперфузия и оксидативен стрес (Park SW et al., 2007; Koh PO et al., 2008). Мелатонинът, потискайки експресията на NF- κ B, намалява активността на iNOS и продукцията на NO и възможността за генерирането на пероксинитрит от NO и O₂- и ограничава неговото увреждащо действие върху митохондриите (Kang JW et al., 2011; Xia MZ et al., 2012). Доказано е, че пероксинитритът стимулира декуплирането на eNOS и повишава продукцията на O₂- (Försterman U et al., 2010). Мелатонинът намалява продукцията на липидни пероксиди, както и ROS/RNS-медираното инактивиране на eNOS (Rodríguez-Reynoso S et al., 2001; Park SW et al., 2007; Huang H et al., 2008) (Фиг 5.3).

Резултатите от настоящото изследване показват, че мелатонинът намалява експресията на NF- κ B, повишената продукция на про-възпалителните цитокини и свободни радикали и вероятно по този начин ограничава тяхното инхибиращо влияние върху eNOS. Мелатонинът повишава нивото на T-SH, продукцията на S-nitrosoglutathione (GSNO), (резервна и транспортна форма на NO) и NO-бионаличност (Elahi MM & Matata BM, 2013), а това може да има допълнителен протективен ефект върху ендотелната функция и върху функциите на черния дроб при ТТ.

4.3.6.2. Ефект на мелатонина върху съдовото възпаление и хемокоагулацията

Редица изследвания показват, че повишената продукция на про-възпалителните цитокини TNF α и IL-6 в плазмата също допринасят за ендотелната дисфункция и съдовото възпаление (Zelová H & Hošek J, 2013). TNF α , произведен от хиперактивирани левкоцити, потиска eNOS експресията от една страна и повишава експресията на ендотелин-1 и на адхезионни молекули, стимулиращи адхезията на левкоцити към ендотела и тяхната активация т.е. на ендотел-левкоцитарното взаимодействие (Montalvo-Jave EE, 2008). Това е сигнал за активиране на NF- κ B в

ендотелните клетки и повишаване на продукцията на про-възпалителни цитокини и адхезионни молекули, при което се формира порочен кръг и се усилва възпалителния отговор (Fan J et al, 2003).

TNF α и IL-6, както и продуктите на липидната пероксидация (MDA и 4-HNE), могат да увредят директно ендотелните клетки и да повишат ендотелния пермеабилитет и хемоконцетрацията (Zelová H & Hošek J, 2013). Тези възпалителни медиатори индуцират също експресията на тъканния фактор (TF) върху повърхността на моноцитите и ендотелните клетки и стимулират процесите на коагулация и микротромбообразуване (Okajima K et al., 2000; Kerr R et al., 2001; Usatyuk PV et al., 2012). TNF α потиска експресията на тромбомодулина (CD114) и протеин С и повишава експресията на инхибитора на активатора на плазминогена (PAI-1) в ендотела, индуциращи про-коагулантно състояние (Uchiba M & Okajima K, 2000; Nan B et al., 2005; Chen C et al., 2009).

IL-6 повишава продукцията на CRP, който е не само медиатор на възпалението, но изпълнява и модулаторни функции. Той пряко участва в поддържането и усилването на възпалението като предизвиква активиране на комплемента, хемотаксиса и експресията на адхезионни молекули (Mortensen RF & Zhong WE, 2000). CRP се свързва директно към неутрофилите, макрофагите и други фагоцитиращи клетки, стимулирайки отделянето на цитокини. Освен това, CRP стимулира експресията на тъканния фактор, осъществява връзката между възпалението и хемокоагулацията (Dhainaut JF et al., 2001).

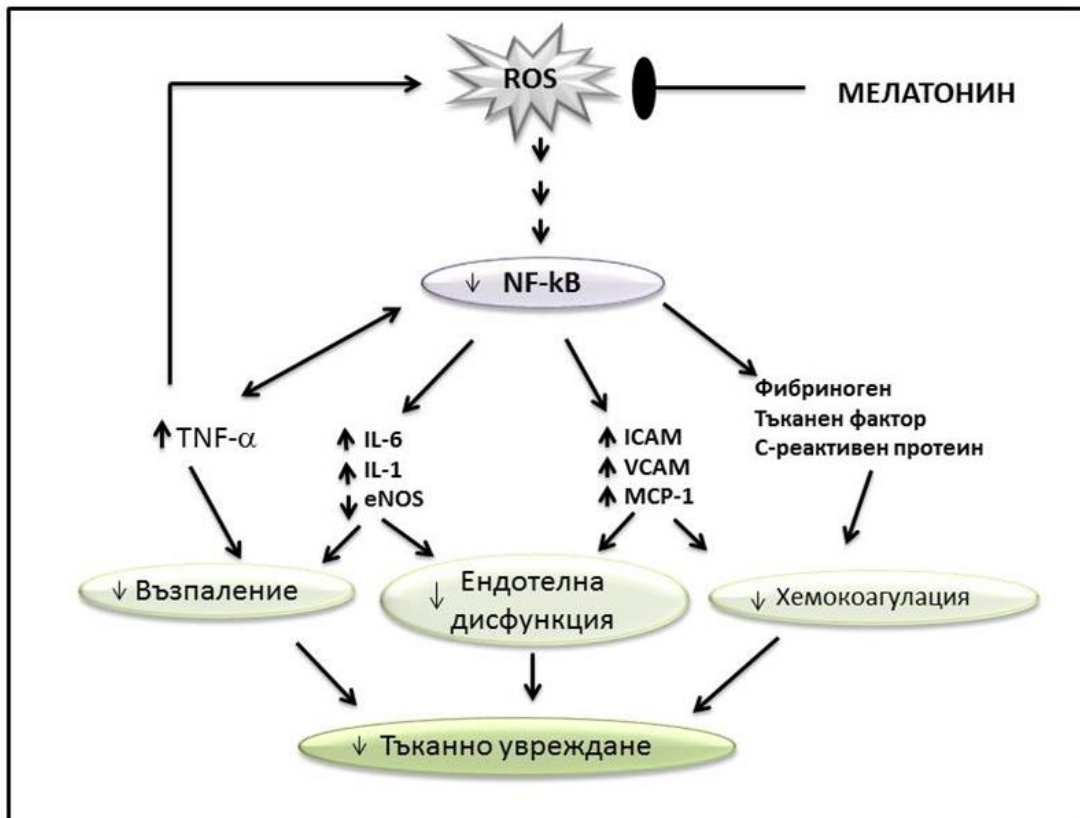
Мелатонинът предотвратява TNF- α медираното потискащо действие върху eNOS (Nduhirabandi F et al, 2014). Мелатонинът има също инхибиращо действие върху активатора на инхибитора на плазминогена (PAI-1) (Tai SH et al., 2010), намалява експресията на NF- κ B и на про-възпалителните медиатори като TNF α и CRP, както и освобождаването на инхибитора на тъканния фактор (TFPI) (Kostovski E et al., 2011).

Данни от настоящото проучване показват, че при повишаване на нивото на липидните пероксиди и цитокините в плазмата се активира външния и вътрешния път на съсирване при ТТ, доказано с повишените нива на РА и на фибриногена (таблица 1 и 2). Резултатите от нашите изследвания са в съответствие с данните от публикуваните напоследък клинични проучвания за промени на тези маркери на хемокоагулацията при ТТ (Lippi G & Cervellin, 2010; Sherren PB et al, 2013). В достъпната литература е открито само едно съобщение относно инхибиращия ефект на мелатонина върху

показателите, свързани с повишената хемокоагулация (РА и аРТТ) при ТТ (Tunali et al, 2005).

Мелатонинът, като антиоксидант и анти-инфламаторен фактор, потиска про инфламаторните и про-коагулационни процеси, индуцирани от ТТ. Основание за това твърдение е установената от нас позитивна корелация между MDA и РА ($r = 0.66$) и MDA и фибриногена ($r = 0.44$) в ТТ групата с мелатонин (фиг.3.4.2.3 фиг.3.4.2.4).

Получените резултати от настоящото проучване показват, че мелатонинът ограничава ендотелното увреждане и локалните процеси на възпаление и хиперкоагулация в острия период след ТТ. Следователно, прилагането на мелатонин е обещаващ подход за ограничаване на тъканната увреда и органна дисфункция при ТТ



Фигура 3.5. Схематично представяне на инхибиращия ефект на мелатонина върху NFkB-медиирания възпалителен отговор и тъканно увреждане на черния дроб при ТТ

4.3.6.3. Ефект на мелатонина върху функционалната активност на кръвните клетки

Акумулирането на липопероксидни продукти в черния дроб индуцира инфламаторен отговор, повишава адхезията на моноцитите към ендотелните клетки и увреждането на съдовия ендотел (Usatyuk PV et al., 2012). Продуктите на липидната пероксидация и про-инфламаторните цитокини увреждат не само ендотела на съдовете, но и кръвните клетки и тяхната функционална активност (Pawlak K et al., 2004; Usatyuk PV et al., 2012).

Еритроцитите са много чувствителни към оксидативно увреждане. Те са постоянно изложени на оксидативен стрес, тъй като постоянно генерират супероксиди при автоокислението на хемоглобина. Освен това еритроцитните мембрани са богати на полиненаситени мастни киселини, които са субстрат за липидната пероксидация (Kucukatay V et al., 2012).

Данни от предишни изследвания показват, че натрупването на липидно-пероксидни продукти (MDA и Шифови бази) и конформационните промени на мембраните на еритроцитите намалява тяхната деформируемост (Marotta F, 2001; Ajmani et al, 2003; Ochoa JJ et al. 2003; Yapislar H & Aydogan S, 2012). Изчерпването на глутатиона и увреждането на мембранните и цитоскелетни протеини при оксидативен стрес е възможен механизъм за влошаване на реологичните свойства на еритроцитите (деформируемост и агрегационна способност) (Srour MA et al., 2000; Ortolani O et al., 2000; Liu QS., 2009 Cluitmans JC, 2012; Grau M et al., 2013). При *in vitro* изследвания е установено, че спектринът в еритроцитната мембрана образува аддукти с 4-HNE и предизвиква агрегация и модифициране на този белтък, а това понижава резистентността на еритроцитите (Arashiki N et al., 2010).

Получените резултати показват, че активирането на липидната пероксидация предизвиква намаляване на флексибилитетта на еритроцитите при ТТ. Активирането на липидна пероксидация в еритроцитните мембрани се свързва също с намалената активност на CuZn SOD и концентрация на α -токоферол в еритроцитите (Beckarova G et al., 1996; Begum AN & Terao J, 2003; Liu QS, 2009). Литературни данни показват, че оксидативният стрес уврежда Ca^{2+} -аза в еритроцитната мембрана, повишава съдържанието на Ca^{2+} в тези кръвни клетки и намалява тяхната флексибилност (Kiefer CR & Snyder LM, 2000). Макрофагите играят важна роля в отстраняване на еритроцитите с нарушен флексибилитет от циркулацията чрез

апоптоза (Mohanty JG et al., 2014). Тези хемореологични нарушения вероятно са причина за хипоперфузията и хипоксията в органите, разположени в спланхниковата област, включително и в черния дроб.

Мелатонинът като директен и индиректен антиоксидант е способен да ограничи оксидативните промени в мембраните на еритроцитите (Ochoa JJ et al., 2003) и да подобри тяхната флексибилност при *in vitro* изследвания (Dikmenoglu N et al., 2008) и при сепсис (Yerer MB et al., 2003). Резултатите от настоящото изследване показват, че мелатонинът потиска пероксидативните процеси и повишава достоверно флексибилитета на еритроцитите при ТТ, но остава по-нисък от тази на контролните жинвотни (фиг. 3.5).

Повишените нива на фибриноген и специално на оксидирания фибриноген повишават спонтанната агрегация на тромбоцитите при ТТ (Levin G & Egorihina MN, 2010). Ние също установихме наличие на тромбоцитни агрегати при микроскопски изследвания в групата с ТТ, които изчезват в третиранията с мелатонин група. Установено е, че мелатонинът протектира тромбоцитите от свободно-радикална атака и намалява тяхната активация (Sener G et al., 2009). Мелатонинът намалява също повишената агрегационна способност на тромбоцитите, предизвикана от оксидативната модификация и екстернализация на фосфатидилсерина в мембраната им. Мелатонинът намалява секреция на серотонин, ADP от тромбоцитите и тяхната агрегационна способност (Daniels WM et al., 1996). Мелатонинът като антиоксидант, анти-инфламаторен и анти-агрегационен фактор показва потискащ ефект върху индуцираните от ТТ про-коагулационни процеси и по този начин мелатонинът може предотврати на микротромбообразуване при ТТ.

Резултатите от настоящото проучване показват, че намалената експресия на eNOS и активирането на локалните процеси на възпаление и коагулация посредством транскрипционния фактор NF-kB допринасят за развитието на ендотелната дисфункция при ТТ. Намаляването на флексибилитета на еритроцитите и повишаването на агрегационната способност на тромбоцитите, резултат от оксидативната модификация на техните мембрани, влошават функционалната активност на тези кръвните клетки. В различни етапи на термичната травма тези процеси биха предизвикали нарушения в микроциркулацията и увреждането на черния дроб.

От получените в настоящото проучване резултати може да се заключи, че мелатонинът повишава експресията на eNOS и тромбо-

резистентността на ендотела, подобрява флексибилитета на еритроцитите и протектира срещу нарушенията в микроциркулацията при ТТ. Протективният ефект на мелатонина върху черния дроб най-вероятно е свързан с потискане на оксидативен стрес и медираните от NF- κ B процеси на ендотелна дисфункция, възпаление, хиперкоагулация и свързаната с тях микроциркулаторна дисфункция (фиг.3.5.).

4.4. Изследване степента на експресия на ензима хем-оксигеназа-1 и на транскрипционния фактор Nrf2 в черния дроб при термична травма и ефект на мелатонина

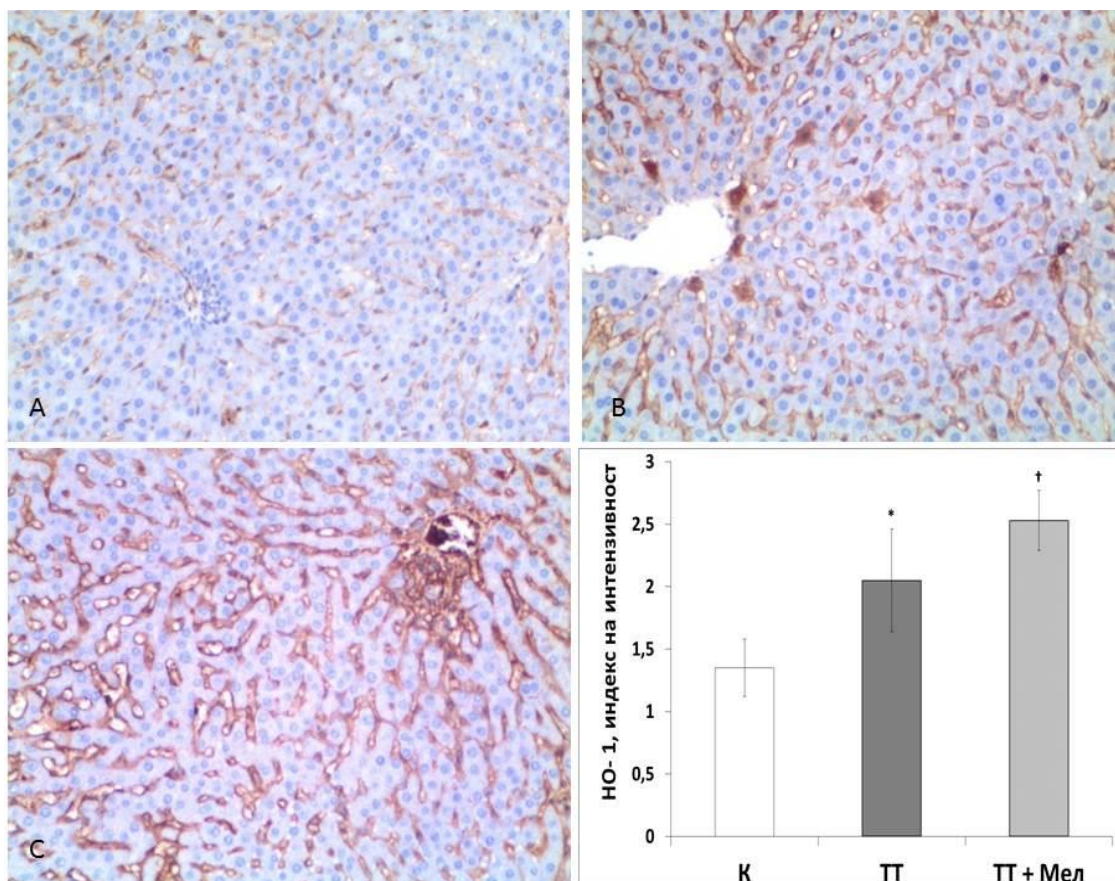
Ензимът хем-оксигеназа-1 (HO-1) играе ключова роля в поддържането на антиоксидант/оксидантната хомеостаза и осигурява протекция на клетките на черния дроб при различни модели на хепатално увреждане (Farombi E & Surh YJ, 2006). HO-1 потиска експресията на NF- κ B, намалява нивото на провъзпалителните цитокини TNF α , IL-6 и IL-1 β (Babu AN et al, 2007; Devey et al, 2009) и повишава това на анти-възпалителния цитокин IL-10 при различни експериментални модели на чернодробно увреждане (Kawamura K et al, 2005; Ashino T et al, 2011).

В достъпната литература има оскъдна информация за промяна в активността на HO-1 в белия и черния дроб при ТТ (Nakae H & Inaba H, 2002). През последните години бе доказано, че оксидативният стрес е един от основните активатори на редокс-чувствителния транскрипционен фактор Nrf2, стимулиращ експресията на HO-1 и други антиоксидантни ензими.

Настоящото проучване изследва експресията на HO-1 и Nrf2 и да проучим дали хепатопротективният ефект на мелатонина е свързан с активирането на Nrf2/HO-1 сигнален път. Използвахме имунохистохимичен метод при изследване експресията на HO-1 и Nrf2, чрез който може да се определи и локализацията на промените в черния дроб.

4.4.1. Експресия на ензима хем-оксигеназа-1 (HO-1) в черен дроб

Имунохистохимичното изследване на ензима HO-1 показва, че той се експресира в СЕК на черния дроб в контролната група и средното му съдържание в клетките е 1.35 ± 0.23 (фиг.4.1, А). Интензивността на имунната реакция в СЕК и хепатоцитите около



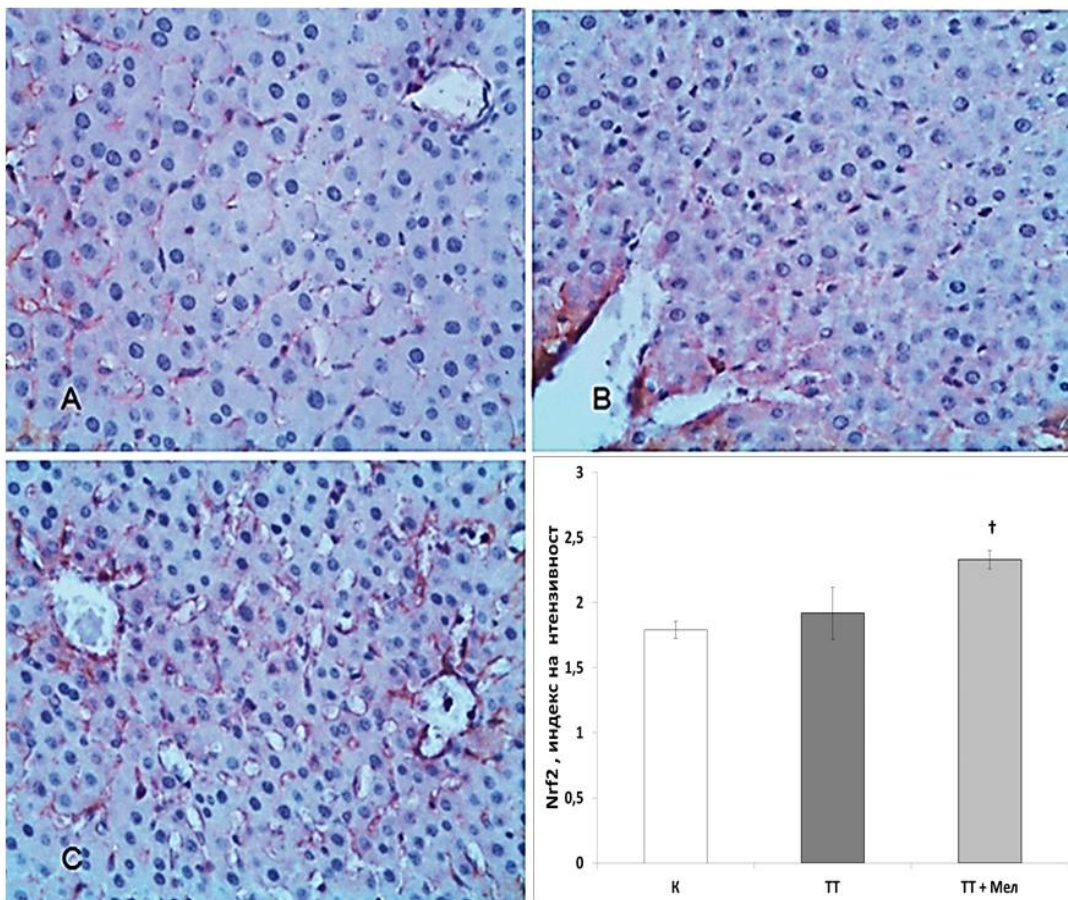
Фигура. 4.1. Имунохистохимичен анализ на експресията на хем-оксигеназа-1 (НО-1) в черния дроб на контролните животни (А), с ТТ (В) и в групата ТТ+Мел (С). Интензивността на ензимната реакция нараства в СЕК и хепатоцитите около централната вена в групата с ТТ. Мелатонинът повишава достоверно експресията на НО-1 спрямо групата с ТТ. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. * $p < 0.01$ спрямо контролната група; † $p < 0.01$ спрямо ТТ групата.

централната вена е умерена или силно изразена в ТТ групата. Средният индекс на ензимното съдържание е 2.05 ± 0.35 и е по-висок с 85% ($p < 0.01$) от този в контролната група. (фиг.4.1, В). Броят на НО-1- позитивните СЕК и хепатоцити в черния дроб се повишава в ТТ+М групата, което допринася за увеличаване на средното съдържание на НО-1 протеин в черния дроб (2.53 ± 0.82), което е с 23% ($p < 0.01$) по-високо от това в ТТ група (фиг.4.2, С).

4.4.2. Експресия на транскрипционния фактор Nrf2 в черен дроб

Имунохистохимичният анализ показва, че транскрипционният фактор Nrf2 е експресиран в цитоплазмата на СЕК в черния дроб в контролната група и индексът на интензивност е 1.68 ± 0.50 ($p < 0.05$)

(фиг.4.4.2, А). Иммунната реакция е умерена до силна в цитоплазмата на СЕК в отделни хепатоцити около централната вена в групата с ТТ и съдържанието на Nrf2 протеин е по-високо от това на контролната група (1.72 ± 0.49 , $p < 0.05$) (фиг.4.4.2, В). Мелатонинът достоверно повишава Nrf2 експресията в цитоплазмата и в ядрата на СЕК и на хепатоцитите в сравнение с с ТТ-групата. (фиг 4.4.2,С). Иммунната реакция е умерена до силно повишена в черния дроб и средното съдържание на протеин е 2.11 ± 0.65 ($p < 0.05$) в ТТ+Мел групата.



Фигура. 4.2. Имунохистохимичен анализ на Nrf2 в черен дроб на контролни животни (А), с ТТ (В) в групата ТТ+Мел (С). Интензивността на ензимната реакция не се променя статистически значимо в групата с ТТ на 24h .Интензивността на ензимната реакция нараства в СЕК и хепатоцитите около централната вена на 24 ч в групата с ТТ. Мелатонинът повишава достоверно експресията на Nrf2 в цитоплазмата и ядрата на СЕК и хепатоцитите спрямо тази в ТТ групата. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. * $p < 0.05$ спрямо контролната група; [†] $p < 0.05$ спрямо ТТ.

4.4.3. Обсъждане

Хем-оксигеназа-1 (HO-1), изоформа на ензима хем-оксигеназа, е ключов ензим в катаболизма на хема, известен е още като heat shock protein 32 (HSP32) и е слабо експресиран в черния дроб и други органи (Bach FH, 2002). (Park SW et al., 2008). Активирането на ензима HO-1 е един от най-важните ендогенни протективни механизми на клетките при стрес, хипоксия, възпаление, хипертермия и хипероксия (Otterbein LEF & Choi AMK 2000; Ryter SW et al., 2002). Изключително малко са проучванията относно ролята на HO-1 в патофизиологията на черния дроб и на други органи при ТТ (Nakae H & Inaba H, 2002).

Резултати от настоящото изследване показват, че експресията на HO-1 се повишава основно в СЕК и в някои хепатоцити на 24 ч след ТТ (фиг.4.1). Този резултат не е неочакван, тъй като има публикувани данни за повишена активност на HO-1 в ендотелните клетки при други модели на хепатално увреждане при исхемия/реперфузия, хепатотоксини (Park SW et al., 2007, Lee CH et al., 2008; Sun BW et al., 2008, 2007, Ashino T et al., 2011).

Мелатонинът повишава HO-1 експресията в СЕК и в хепатоцитите в групата с ТТ+ Мел, която е достоверно по-висока в сравнение с тази в ТТ групата. Паралелно с това мелатонинът намалява достоверно нивото на продуктите на липидната пероксидация (MDA и 4-HNE) и плазмените трансминази (AST и ALT), както и хистопатологичните промени след термо-въздействието. Подобни промени са наблюдавани и от други автори, които свързват хепатопротективния ефект на мелатонина с активирането на HO-1 в ендотелните клетки в условията на оксидативен стрес (Jung KH, 2009; Park SW et al., 2007).

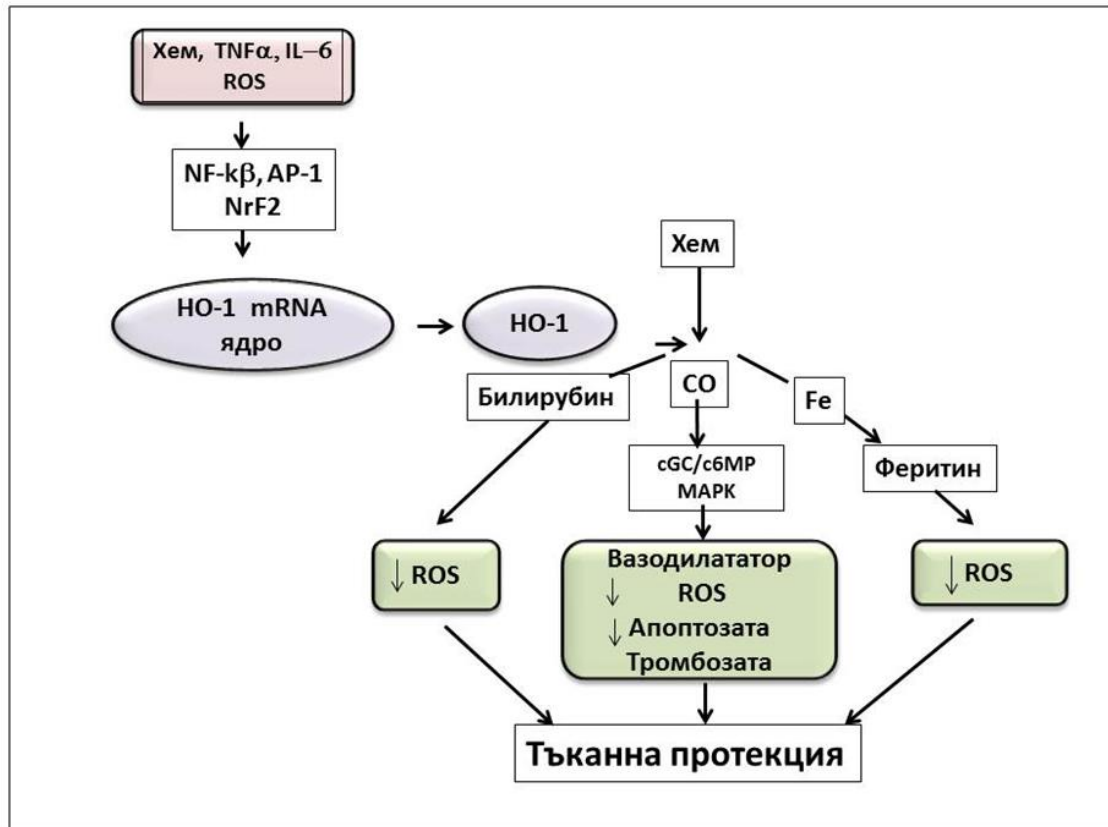
Антиоксидантното и цитопротективно действия на ензима HO-1 се реализира основно чрез неговите метаболити - билирубин, СО и феритин (Yesilkaya AR et al., 2000; Otterbein LE & Choi AMK, 2000). Те се свързват със способността на ензима хем-оксигеназа.1: (1) „да контролира ниво свободния хем” (Ferris SD et al, 1999) и да стимулира синтеза на желязо-свързания белтък феритин, притежаващ антиоксидантни свойства. (Bauer et al, 2002); (2) на билирубина да прихваща пероксилните радикали като витамин Е, един от мощните антиоксиданти срещу липидната пероксидация (Otterbein LE & Choi AMK, 2000); (3). на СО да повишава експресията на антиоксидантните гени и инхибира активността на про-оксидантните ензими (Piantadosi CA, 2006).

При нашето изследване е установено, че нивото на билирубина намалява, което вероятно се дължи на повишената му консумация като антиоксидант при активиране на свободно-радикални процеси в групата животни с ТТ. Билирубинът, който циркулира в плазмата като комплекс албумин-билирубин, прихващайки пероксинитрита се трансформира в албумин-биливердин и вероятно поради това ние не установихме повишаване на нивото на общия билирубин, въпреки повишената активност на HO-1 при ТТ. Затова вместо промяната в нивото на отделните продукти на HO-1 един по-добър подход може да се окаже изследване на активността на HO-1 заедно с промените в нивото на отделните негови продукти.

Резултатите от нашето проучване и литературните данни дават основание да предположим, че мелатонинът чрез повишаване експресията на HO-1 потиска NF- κ B-медираната продукция на про-възпалителни цитокини и увреждането на черния дроб при ТТ. Мелатонинът посредством активиране на CO/HO-1 модулира възпалението като намалява чернодробните нива на про-възпалителните цитокини като TNF- α , IL-6, IL-1 и повишава продукцията на анти-възпалителните цитокини (IL-10) при различни експериментални модели (Otterbein LE et al., 2000 в; Kawamura K et al., 2005).

HO-1 има вазоактивни свойства и способност активно да поддържа чернодробната микроперфузия и окислителните процеси посредством CO (Suematsu M et al., 1995). CO освен вазодилатор, инхибира експресията на ET-1 (Morita T et al., 1995b), потиска тромбоцитната агрегация (Chlopicki S et al., 2012) подобно на NO и участва в поддържането на перфузията на черния дроб при стресови състояния (Bauer I et al., 1998).

Доказано е, че CO, билирубинът и биливердинът поотделно или в комбинация протектират ендотелните клетки от апоптоза, индуцирана от свободни радикали и цитокини (Soares MP et al., 2002). HO-1 модулира съдовия тонус, потиска възпалителния процеси и апоптозата на ендотелните клетки и повишава защитата на клетките при стресови състояния (Loboda A et al., 2008). Данни от последните години показват, че ензимът HO-1 активира ендотелните прогениторни клетки към мястото на съдовото увреждане при различни експериментални модели (Wu BJ et al., 2009).



Фигура 4.3. Протективно действие на хем-оксигеназа-1 върху тъканите, което се реализира чрез ефектите на неговите продукти-СО, билирубин и феритин

Мелатонинът, повишавайки експресията на HO-1– ензим увеличава антиоксидантния потенциал, потиска възпалителния отговор, увреждането и апоптозата на ендотелите клетки и хепатоцитите в черния дроб. Считаме, че активирането на HO-1 под действие на мелатонина е нов механизъм за хепатохротекция при ТТ.

Транскрипционният фактор Nrf2 повишава експресията на HO-1 и на други антиоксидантни ензими като каталаза, GPx и CuZn SOD и играе важна роля в защитата в клетките срещу оксидативен стрес (Trachootham et al., 2008; Jaiswal AK., 2004; Osburn WO et al., 2006, Yang YC., 2011). Данни за активиране на Nrf2/HO-1 като защитен механизъм в клетката има при модели на хепатален и оксидативен стрес, индуциран от тетрахлорметан, ацетаминофен, бензопирен и бензен (Chan K et al., 2001; Aleksunes LM & Manautou JE, 2007; Farombi EO et al., 2008; Reisman SA et al., 2009; Crespo I et al., 2010). Наскоро е установено, че активирането на Nrf2/ARE--сигнален път

играе важна роля в ендотелната протекция при оксидативен стрес (Urgvari Z et al., 2011).

Резултатите от настоящото проучване показаха слабо повишение на експресията на Nrf2, основно в цитоплазмата на ендотелните клетки и някои хепатоцити при животните с ТТ спрямо контролите (фиг 4.2). Мелатонинът достоверно повишава експресията на транскрипционния Nrf2 и тя е още по-интензивна в цитоплазмата на хепатоцити, но е представена също и в ядрата на ендотелните клетки при ТТ-групата.

Мелатонинът повишава експресията на Nrf2 и на антиоксидантните ензими като HO-1 и при други модели на чернодробно увреждане (Jung KH et al., 2009; Crespo I et al., 2010; Li Volti G et al., 2012). Естествените антиоксиданти (флавоноидите) повишават също Nrf2/ARE-медирана експресия на гените на HO-1 и на други антиоксидантни ензими и ограничават оксидативните увреждания в черния дроб (Domitrović R et al., 2013; Choi JH et al., 2011, Nussler AK et al., 2010).

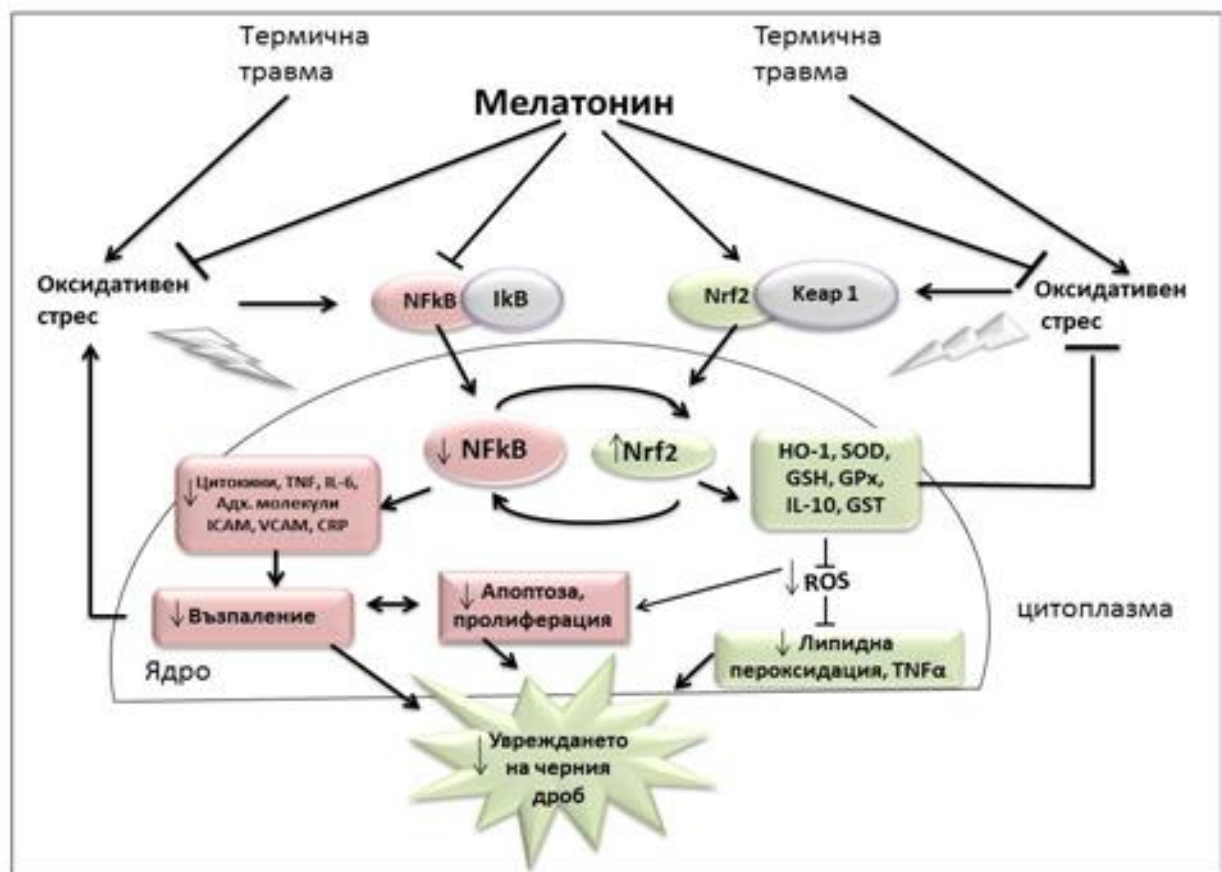
Възможен механизъм, чрез който мелатонинът повишава експресията на Nrf2 е свързан с дисоциацията на Nrf2 /Kear 1 (репресор) и транслокация на Nrf2 към ядрото, където той се свързва с ARE в промотора на гени, участващи в антиоксидантната защита (Aleksunes LM et al., 2007; Jung KH et al., 2009) (Фиг 4.3). Активирането на Nrf2/ARE път стимулира експресията на гените на HO-1 и на други антиоксидантни ензими като GGL, GST, SOD (Lu SC et al., 2009). Активността на тези респонсни елементи се регулира от изменения в редокс баланса в клетката, най-вероятно медирано от сулфхидрилни групи (Ryter SW et al., 2003).

В настоящото проучване мелатонинът повишава експресията на Nrf2 и намалява експресията на про-възпалителните медиатори TNF α и IL-6. От друга страна ние установихме повишени експресия Nrf2 и ниво на анти-възпалителния цитокин IL-10, отговорен за клетъчната протекция при възпаление. Тези данни показват, че транскрипционният фактор Nrf2 регулира не само експресията на гените на антиоксидантни ензими, но също може да модулира баланса между про- и анти-възпалителните медиатори. Повишената транслокация на NF- κ B в групата с ТТ е инхибирана от мелатонина (Фиг. 2.1).

Резултатите от нашето изследване са в съответствие с данните за инхибиращо действие на Nrf2 върху експресията на про-възпалителните медиатори TNF α , IL-1 β , IL-6 (Jung KH et al., 2009), както и върху продукцията на хемокини, адхезионни молекули, металопропротеинази (MMP-9), циклооксигеназа-2 (COX-2) и iNOS (Kim

J et al., 2010), индуцирани от транскрипционния фактор NF-κB (Chen X et al., 2006; Jin W et al., 2008; Li W et al., 2008) при други експериментални модели на чернодробно увреждане. Тези данни убедително показват, че активирането на Nrf2-сигнален път играе важна роля и в потискането на възпалителния отговор при ТТ.

Публикуваните в литературата данни и резултатите от настоящото изследване показват, че мелатонинът повишава експресията на HO-1 и Nrf2, паралелно с намаляване експресията на NF-κB и нивото на про-възпалителните медиатори (Фиг.4.4). Може да се предположи, че мелатонинът играе важна роля в защита на клетките срещу оксидативен стрес чрез активиране на транскрипционния фактор Nrf2, който потиска инфламаторния отговор чрез намаляване експресията на NF-κB. Необходими за бъдещи изследвания, за да се проучи взаимосвързката между транскрипционните фактори NF-κB и Nrf2, регулиращи процесите на възпаление и антиоксидантна защита при ТТ.



Фигура 4.3. Обобщено представяне влиянието на мелатонина върху ROS-активираниите транскрипционни фактори: NF-κB-регулиращ про-инфламаторните медиатори и Nrf2- активиращ антиоксидантните механизми в комплексния патологичен отговор при ТТ.

От получените резултати в настоящото проучване може да се заключи, че мелатонинът повишава експресията на HO-1 в черния дроб след ТТ. Активирането на транскрипционния фактор Nrf2 играе важна роля за повишената HO-1 експресия, индуцирана от мелатонина. За първи път е показано, че мелатонинът активира Nrf2/HO-1 сигнален път при ТТ и действа като естествен индуктор на антиоксидантна защита. Стимулирането на защитните механизми на клетката чрез антиоксидант-активиращи транскрипционните фактори, какъвто е Nrf2, е новооткрит механизъм за протекция срещу увреждането на черния дроб при ТТ. Необходими са по-нататъшни научни проучвания върху молекулярните механизми на действие на транскрипционния фактор Nrf2 в предвид възможностите за разработване на нов подход при терапията на пострадали с ТТ.

4.5. Ефект на мелатонина върху активността вазорегулаторните ензими- ендотелна NO-синтаза (eNOS) и хем-оксигеназа-1 (HO-1) в черния дроб при термична травма

Данните от нашите изследвания показват, че при модел на ТТ експресията на eNOS намалява, докато HO-1 активността в черния дроб се повишава в острия период след ТТ (фиг. 3.1 и фиг. 4.1). За първи път бе установено, че мелатонинът повишава експресията на двата вазорегулаторните ензими eNOS и HO-1, паралелно с ограничаване на увреждането на черния дроб в острия период след ТТ. Получените от нас резултати са в съответствие с тези на други автори, които установяват, че мелатонинът повишава експресията на eNOS и HO-1, намалява iNOS активността и ограничава ROS-медираното увреждане на черния дроб при експериментален модел на исхемия/ реперфузия (Park SW et al., 2007).

Въглеродният оксид (CO) генериран при активирането на HO-1, е вазодилаторен медиатор като NO (Hartsfield CL et al., 2002; Foresti R et al., 2003; Wunder C and Potter RF, 2003; Choi YK et al, 2012). CO, както и NO активират гуанилат циклаза (GC) и по този начин повишават нивата на цикличния гуанозинмонофосфат (cGMP) (Фиг.7) в клетките на Ito, микроваскуларните перипити, обграждащи СЕК и по този начин контролират съдовия тонус и микроциркулацията в черния дроб (Kamamoto Y et al., 1996).

При физиологични условия продукцията на CO е ниска и способността му да активира GC е много по-слабо изразена в сравнение с тази на NO (Brune B & Ullrich V, 1987; Christova T et al.,

2000, Morita T et al., 1995a). При исхемия, възпаление, стрес и други патологични състояния активността на HO-1 се повишава, а ролята на CO за поддържане на тъканната микроциркулация нараства (Otterbein L E & Choi AMK, 2000; Morse D & Choi AM, 2005; Choi et al., 2012; Liu D et al., 2012).

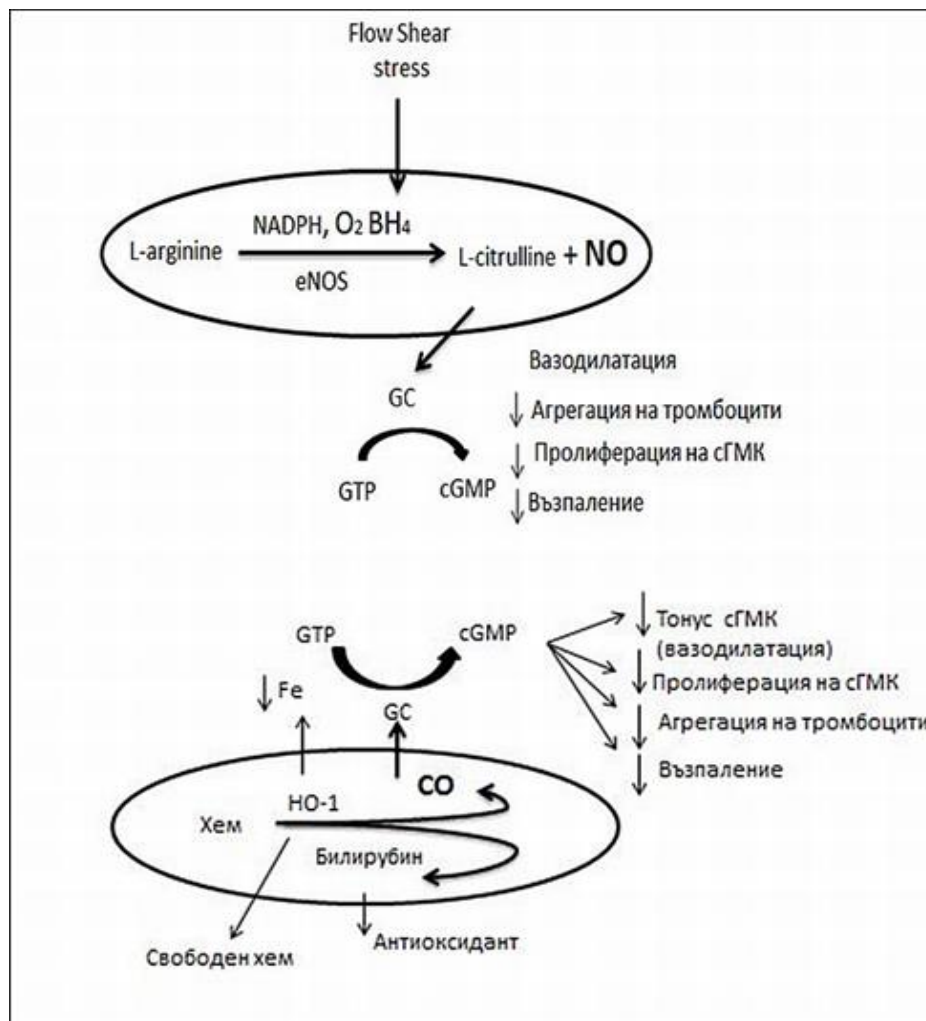
Допълнително, CO може да инхибира експресията на ET-1 и да потиска експресията на провъзпалителните цитокини и стимулираното от тях акумулиране на левкоцитите в съдовете (Sun BW et al., 2007). По този начин CO подобрява микроциркулацията в черния дроб при хипоксични състояния (Morita T & Kourembanas S, 1995a). Защитният ефект на HO-1 върху ендотелната функция се свързва със способността му да потиска TNF α -индуцирана експресия на различни адхезионни молекули при възпаление (Soares MP et al., 2004). CO притежава вазоактивни свойства и може да участва в поддържането на перфузията на черния дроб при стресови състояния (Bauer M et al, 1998; Durante J et al, 2002). При модел на хеморагичен шок е установено, че инхибирането на HO-1, а не на eNOS може да повиши съдовата резистентност в черния дроб, да предизвика нарушения в микроциркулацията и увреждане на черния дроб (Pannen BH et al., 1998).

Въпреки, че не са напълно изяснени сложните и деликатни връзки между HO-1 и eNOS (Hartsfield CL, 2002), съществуват данни, че повишената експресия на двата вазорегулиращи ензими HO-1 и eNOS предотвратява чернодробното увреждане при експериментален модел на исхемия/ реперфузия (Amersi F et al., 1999; Katori M et al., 2002; Lee CH et al., 2008; Choi YK et al., 2012). Експресията на ензима HO-1/CO в условията на хипоксия и оксидативен стрес е повишена вероятно, за да компенсира намалена NO-бионаличност, да ограничи ендотелната дисфункция и увреждането на черния дроб в острия период след ТТ.

Както вече е отбелязано, възможен механизъм за намаляване на eNOS активност е инхибиращото действие на свободни радикали и цитокини върху експресията на този ензим в съдовия ендотел. Ендотелната eNOS съдържа оксидазен и редуктазен домен. При окисление на тетрахидробиоптерина (H4B), кофактор на eNOS в условията на оксидативен стрес, този ензим произвежда освен от O₂⁻ и NO, правейки ензима източник на пероксиднитрит. Произведеният при декуплирането на eNOS пероксиднитрит се смята за един от основните фактори увреждащи тъканите при ТТ (Rawlingson A, 2003).

CO, притежаващ антиоксидантни свойства е възможно да инхибира окислението на H4B и да предотврати декуплирането на

eNOS. Активирането на HO-1 чрез включване на този механизъм може да подобри NO-бионаличност, както и ендотелната функция и микроциркулация в черния дроб при ТТ.



Фигура 5 Азотният оксид (NO/eNOS) и въглеродния оксид CO/HO-1 реализират много от ефектите си активирайки гуанилатциклаза (sGC) и повишавайки нивото на вътреклетъчния цикличен гуанозин монофосфат (cGMP) в съдовите гладко-мускулни клетки (сГМК).

В заключение, резултатите от настоящото проучване показват, че мелатонинът модулира експресията на двата вазоактивни ензима (eNOS и HO-1) чрез потискане на оксидативния стрес и възпалението в черния дроб при ТТ. Чрез повишаване на експресията на HO-1, мелатонинът подобрява антиоксидантния потенциал, което вероятно допринася за инхибиране на ROS-медираното увреждане на eNOS. Представяйки хипотезата, че повишаването на активността на eNOS и HO-1 ограничава

ендотелната дисфункция, увреждането на микроциркулацията и подобрява чернодробната функция, много вероятно е мелатонинът чрез този механизъм да осъществява хепатопротективен ефект при ТТ.

4.6. Определяне съдържанието на про- и анти-апоптотични протеини и степента на пролиферация в черен дроб при термична травма и установяване ефекта на мелатонина

При физиологични условия съществува баланс между пролиферация и апоптоза, чрез които се поддържа тъканната хомеостаза в черния дроб. Нарушенията на баланса между апоптозата и пролиферацията може да доведат до промени в органната функция и хомеостаза, включително и на черния дроб, които могат да се възстановят или чрез потискане на апоптозата или чрез засилване на регенерацията (Sun Z et al., 1998).

Протеините от Bcl-2 фамилията са едни от широко изследваните маркери на митохондриалния път на апоптозата. Някои от тях като Bcl-2 и BclXL са анти-апоптотични и тяхната биологична функция е да се противодействат на много апоптотични сигнали и да увеличават продължителността на живот на клетката. Протеините Bax, Bad или Bid се активират от апоптотични сигнали като стрес, DNA увреждане и външни death receptors и са про-апоптотични (Yin XM, 2000; Zimmermann KC, 2001). Все повече са доказателствата, че балансът между про-апоптотичните Bax и анти-апоптотичните Bcl-2 протеини т.е. Bax/Bcl-2 определя съдбата на клетката - да загине или оцелее, а не експресията на отделните апоптогенни протеини (Yuan et al., 2000; Lucken-Ardjomande S & Martinou JC, 2005). При изследване на експресията на апоптотичните протеини Bax и Bcl-2, както и на пролиферативния маркер в черния дроб е използван имунохистохимичен метод.

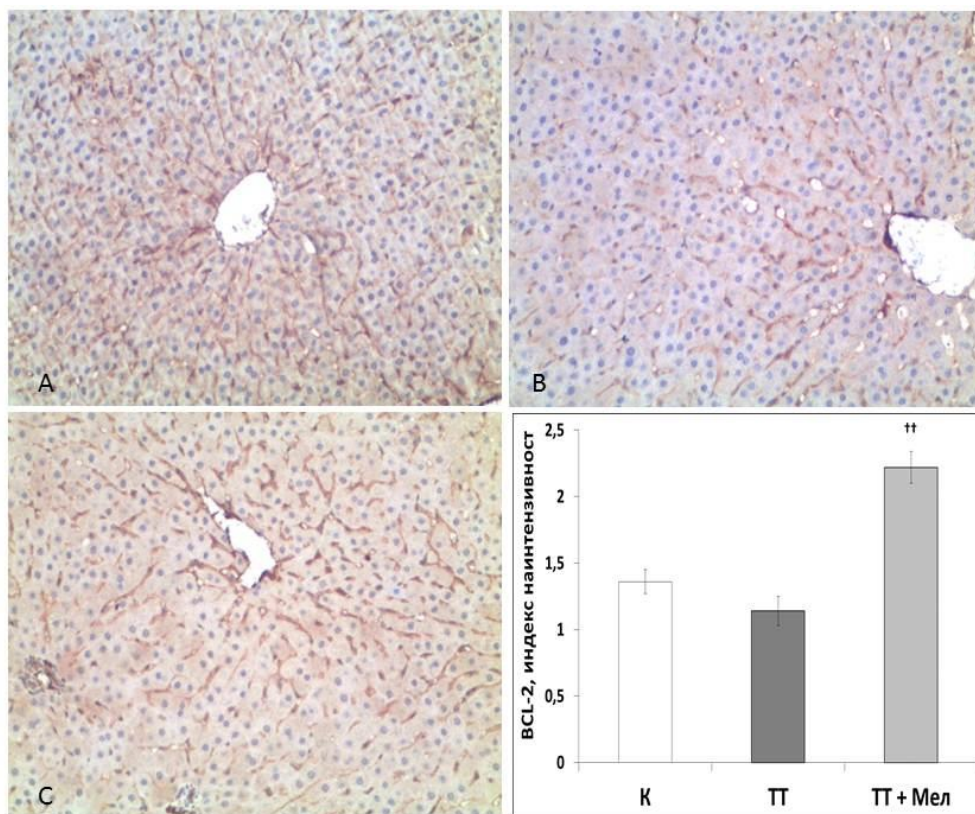
4.6.1. Експресия на анти-апоптотичния Bcl-2 протеин

Имунохистохимичното изследване показва, че анти-апоптотичния Bcl-2 протеин се експресира в слаба до умерена степен в СЕК в черния дроб на контролната група и средното съдържание на протеина в клетките е 1.36 ± 0.48 . Bcl-2 позитивна реакция е установена и в отделни хепатоцити (фиг. 6.1, А). Индексът на интензивност на имунната реакция е 1.14 ± 0.69 в

групата ТТ и не отбелязва статистически значими промени спрямо този на контролните животни (фиг. 6.1, В). Средното съдържанието на Bcl-2 протеина нараства (2.22 ± 0.74) достоверно с около 60% ($p < 0.01$) в групата ТТ+Мел спрямо това на контролната група (фиг. 6.1, С).

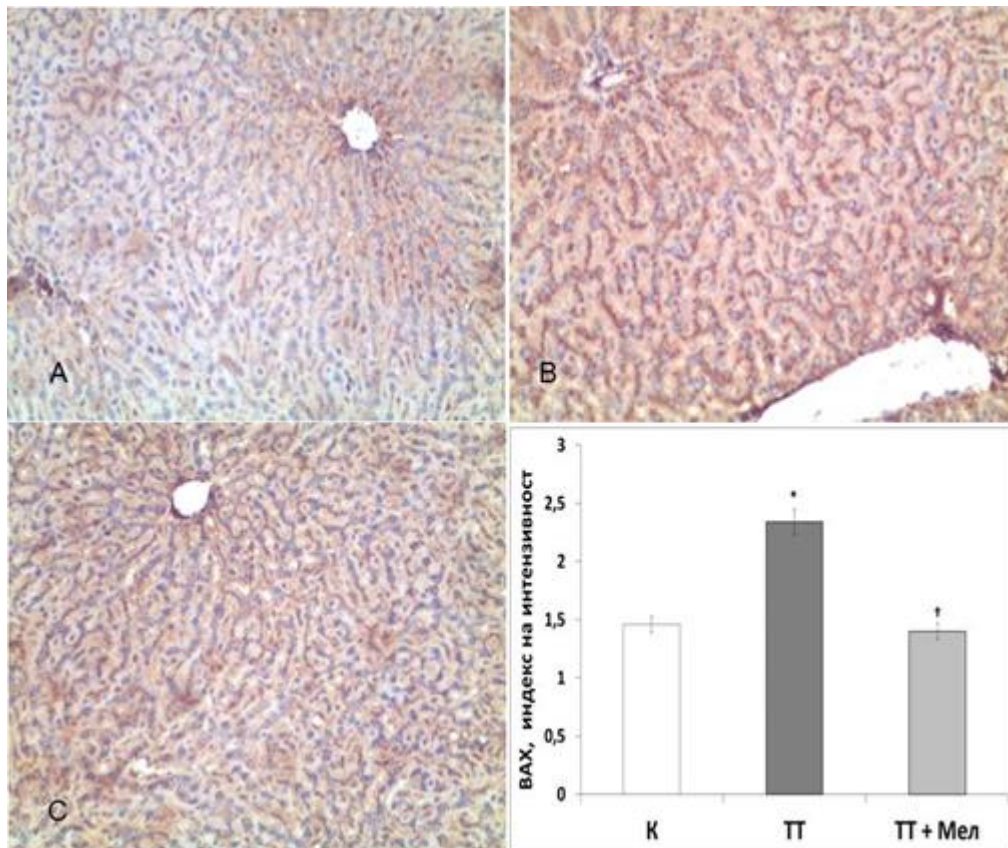
4.6.2. Експресия на про-апоптотичния Вах протеин

Резултатите от имунохистохимичното изследване показват, че про-апоптотичният Вах протеин е експресиран основно в СЕК. Интензивността на имунната реакция варира от лека до умерена степен (1.46 ± 0.29) (Фиг.5.2, А).



Фигура 6.1. Имунохистохимичен анализ на експресията на ензима Bcl-2 в черен дроб на контролни животни (А), с ТТ (В) в групата ТТ+Мел (С). Интензивността на ензимната реакция не се променя статистически значимо в групата с ТТ на 24 h след ТТ. Мелатонинът повишава достоверно експресията на Bcl-2 след ТТ. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. †† $p < 0.01$ спрямо ТТ групата.

В ТТ група интензивността на имунната реакция в отделните клетки е умерена или силно изразена. Средното ензимно съдържание е 2.34 ± 0.59 и е по-високо (с 60%, $p < 0.01$) от този на контролната група (Фиг.6.2, В). Интензивността на имунната реакция в СЕК и е по-високо (с 60%, $p < 0.01$) от този на контролната група (Фиг.6. 2, В). Интензивността на имунната реакция в СЕК и хепатоцитите намалява с 87% ($p < 0.05$) в групата с ТТ+М спрямо тази на ТТ групата до стойности близки до контролните (Фиг.6.2, С).



Фигура 6.2. Имунохистохимичен анализ на експресията на про-апоптотичния протеин Вах в черен дроб на контролни животни (А), с ТТ (В) в групата ТТ+Мел (С). Интензивността на ензимната реакция се повишава в синусоидалните клетки и отделни хепатоцити в групата с ТТ и намалява достоверно при въздействие с мелатонин (ТТ+Мел) група. Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. * $p < 0.01$ спрямо контролната група; * $p < 0.05$ спрямо ТТ-групата.

4.6.3. Промени в индекса Вах/Всl-2 в черния дроб при ТТ

Както се вижда от таблица 1 Вах/ Всl-2 индексът се повишава с 90 % ($p < 0.05$) в ТТ групата, в сравнение с този от контролната група. След третиране с мелатонин Вах/ Всl-2 индекс намалява спрямо този на ТТ група (с 60%, $p < 0.05$) и се доближава до този на контролната група.

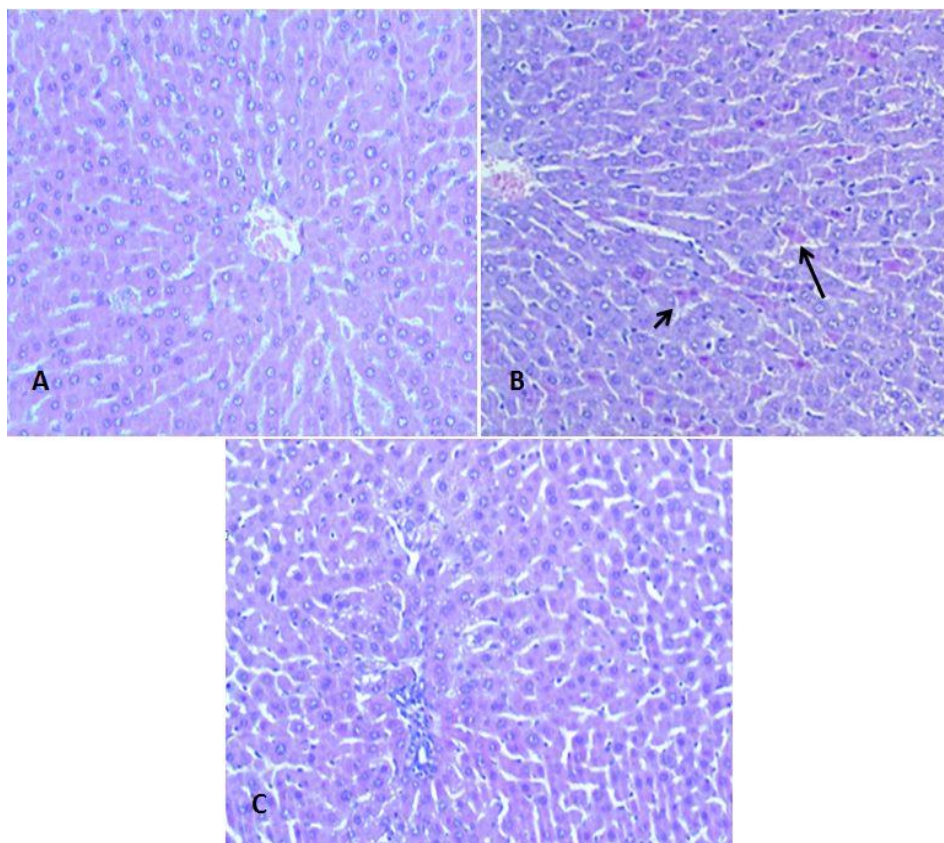
Таблица 5 Промени в експресията на Всl-2 и Вах протеините (индекс на интензивност) и отношението Вах/Всl-2

Група	Всl-2	ВАХ	ВАХ / Всl-2
Контролна	1.36 ± 0.048	1.46 ± 0.25	1.07
ТТ - група	1.14 ± 0.69	2.34 ± 0.59*	2.05*
ТТ + Mel група	2.22 ± 0.74+	1.76 ± 0.29+	0.80*

Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност.; * $p < 0,05$ сравнение с контролната група; * $p < 0.05$ спрямо ТТ група.

4.6.4. Морфологично изследване на черен дроб

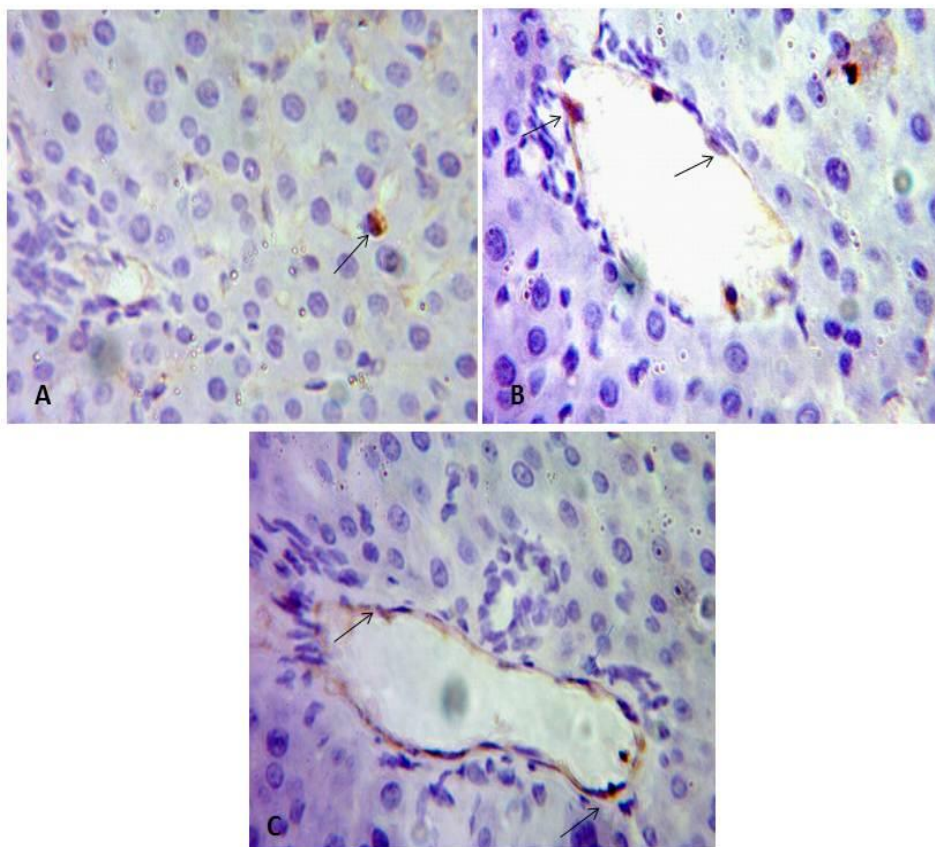
Хепатоцитите са с нормална форма и големина и везикуларни ядра в контролната група (Фиг.6.4, А). В групата с ТТ хепатоцитите са с нарушена структура, с ацидофилна дегенерация и вакуолизация на хепатоцитите, налице са множество апоптотични клетки (фиг 6.4, В). Хепатоцитите са с относително запазена структура с редуциран брой на апоптотичните клетки в черния дроб в групата ТТ на животните на след прилагане на мелатонин (ТТ+Мел) (фиг.6.4,С).



Фигура 6.4. Хистопатологични изменения в черен дроб на контролна група (A), група с ТТ(B), ТТ+Мел групата (C) Original magnification, 400. H & E. Стрелките показват апоптотичните телца (оцветени по интензивно от еозина).

4.6.5. Експресия на Ki 67 пролиферативния маркер в черния дроб

Имунохистохимичното изследване на показва единични Ki67 положително клетки в контролната група (фиг 6.5.A). Единични имуноположителни клетки се наблюдават в синусоидите около централната вена в черния дроб на ТТ група (фиг 6.5.B) Повече позитивни за Ki67 ендотелни клетки на черния дроб се наблюдават при третиране с мелатонин (фиг 6.5.C). Липсват данни за достоверно повишаване на експресията на пролиферативния маркер след прилагане на мелатонин.



Фигура 6.5. Имунохистохимичен анализ на експресията на Ki 67 пролиферативния маркер в черния дроб на контролни животни (A), с ТТ (B) в групата ТТ+Мел (C). Виждат се единични Ki 67 имуноположителни клетки в контролната група. Интензивността на ензимната реакция се повишава до статистически недостоверни различия в групата с ТТ на 24 ч след ТТ. Мелатонинът не променя достоверно експресията на Ki67 пролиферативния маркер след ТТ.

4.6.6. Обсъждане

Програмираната клетъчна смърт (апоптозата) играе важна роля в развитието на остро-настъпващите патологични увреждания в много органи, включително в органите в спланхниковата област. Данни от литературата показват, че термичната травма индуцира „системен апоптотичен отговор“ (Gravante G., 2007). Патофизиологичните механизми на апоптозата при чернодробно увреждане не са напълно изяснени. Възможни механизми на клетъчната смърт са хипоперфузията, исхемията и последващата реперфузия, повишената продукция на про-инфламаторни цитокини и свободни радикали (Jeschke et al., 2001; Vemula M et al., 2004;

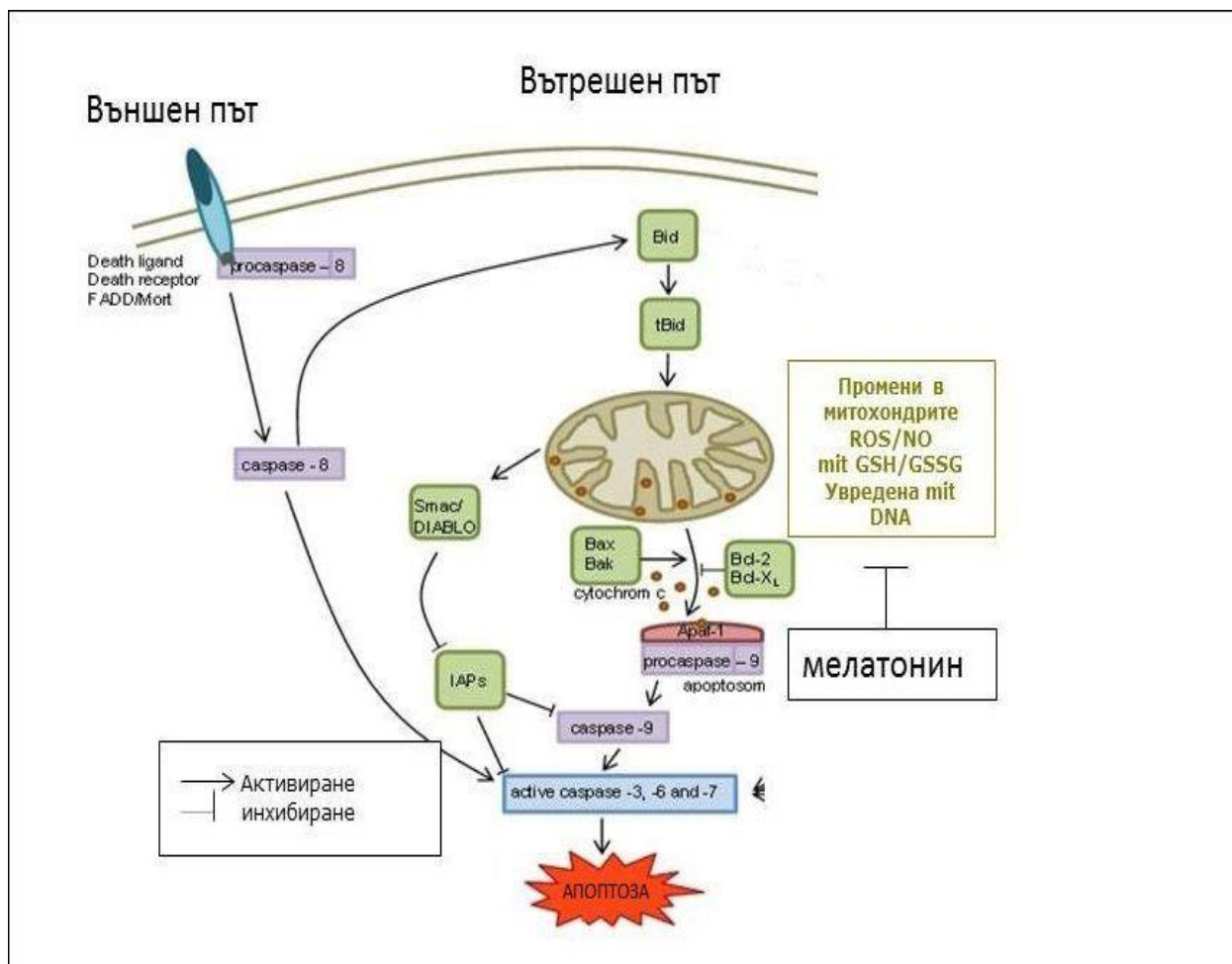
Radogna F et al., 2009). Литературните данни показват, че оксидативният стрес участва като важен механизъм в апоптотичния процес (Le Bras M et al., 2005; Valko M et al., 2007). Липсва достатъчна информация относно ролята на оксидативния стрес в развитието на апоптотичния процес, индуциран от ТТ в клетките на черния дроб и други органи.

Митохондриите са много чувствителни към увреждащото действие на липидните пероксиди (4-HNE), които оксидират SH-групи (цистеин, метионин) на глутатиона, променят редокс-статуса и са ранен и силен активатор на апоптотичните сигнали (Amstrong JS., 2002; Fleury C, 2002; Le bras M et al., 2005). Дефицитът на GSH, Gpx, MnSOD, тиоредоксин (Trx) стимулира апоптозата (Karoo R & Kakkar P, 2012; Yuan L & Kaplowitz N, 2009).

При увреждане на mtDNA (вътрешен сигнал) про-апоптотичните Bax протеини, претърпяват конформационни промени и се транслокират от цитозола към митохондриалната мембрана, където са локализиран анти-апоптотичните Bcl-2 протеини, при което настъпва дисбаланс в експресията на анти-апоптотичния Bcl-2 и про-апоптотичния Bax протеин с превалиране на последния (Фиг 5.1 и 5.2). Това води до повишаване пермеабилитета на митохондриалната мембраната, освобождаване на цитохром С и активиране на каспазната каскада (Chandra J et al., 2000; Lucken-Ardjomande S et al., 2005; Wang X et al., 2008; Edlich F et al., 2011; Estaquier J et al., 2012).

Резултатите от настоящото проучване показват повишена експресия на 4-HNE в черния дроб и увеличен брой на апоптотичните клетки (фиг.1.1.2 и фиг 6.4). Няколко са публикуваните хипотези за про-апоптотичното действие на 4-HNE: 1). Директно увреждане mtDNA и активиране на митохондриалния апоптотичен път; 2). Инхибиране на митохондриални протеини (канални) като ANT поради окисление на SH-групи, което предизвиква повишаване на пропускливостта на митохондриалните мембрани за цитохром С; 3). Инхибиране действието на анти-апоптотичните Bcl-2 протеини (Vieira HL et al., 2001).

Нашите данни показват повишена експресия на про-апоптотичния Bax протеин, както и на отношението Bax/Bcl-2, а експресията на анти-апоптотичния Bcl-2 протеин в черния дроб не се променя в експерименталната група и тя остава слаба след термичната травма (таблица 5.) По-високите стойности на апоптотичния индекс Bax/Bcl-2 в експерименталната (ТТ) група в сравнение с контролната (С) група вероятно се дължат на повишената експресия на Bax протеина.



Фигура 6.6. Схематично представяне анти-апоптотичния ефект на мелатонина върху митохондриалния път на апоптозата. Вътрешният апоптотичен път се задейства на ниво на митохондриите под действие на апоптотични сигнали (увреждания в мДНА), които активират про-апоптотичните протеини Bax и предизвикват транслокация им към външната митохондриална мембрана, където са локализирани анти-апоптотичните Bcl-2 протеини, свързват се с тях и образуват хетеродимери. Дисбалансът между анти-апоптотичния Bcl-2 и про-апоптотичния Bax протеин с превес на последния предизвиква образуване на пори в мембраната, освобождаване на цитохром C и активиране на каспази 9 и 3. Външни death сигнали като TNF α или Fas ligand могат да активират митохондриалния апоптотичен път чрез tBid протеина.

Резултатите от настоящото изследване показват, че промените в експресията на Bax и Bcl-2 протеините са главно в СЕК и в някои хепатоцити в региона на централната вена при опитните животни (фиг.6.1 и фиг.6.2), където исхемията е по-изразена в сравнение с останалата част на черния дроб поради спазъм на съдовете в спланхниковата област и микроциркулаторните нарушения в острия период след ТТ. Логично е ендотелните клетки,

поради по-слабата антиоксидантна защита да са по-чувствителни към хипоксия и увреждащото действие на свободните радикали и цитокините. Вероятно поради това клетъчната смърт на СЕК настъпва по-рано в сравнение с хепатоцитите (Natori S et al., 1999). Други автори също установяват дисбаланс между Вах и Bcl-2 протеините в митохондриалната мембрана и апоптоза на синусоидалните ендотелни клетки (Motoyama S et al., 1998, Deaciuc IV et al., 2001; Yue LH et al., 2010), както и на хепатоцитите в условията на повишен оксидативен стрес при студов модел на I/R (Rauen et al., 1999).

Резултатите от нашите изследвания са в съответствие с тези на други автори, които установяват дисбаланс между про- и анти-апоптотични протеини, медиращ апоптозата на хепатоцитите (Klein et al, 2004), кардиомиоцитите и интестоцитите при ТТ (Yagmurdur H et al, 2007; Duan H et al, 2009, Lv GF et al, 2011).

Данни от литературата показват, че експресията на про-апоптотичните Вах протеини в митохондриите е възможно да се повиши и под действието на външни death сигнали като TNF α или Fas ligand (Yin XM, 2000 ; Wei MC et al., 2001; Zhao Y et al., 2003; Ding WX et al., 2004; Shuh et al., 2013) (Фиг. 6.6). Про-апоптотичният Bid протеин е субстрат на каспаза 8. При активирането на Fas/TNF α -R1 път отцепеният C-терминал на Bid (tBid) може да се транслокира към митохондриите и да повиши експресията на Вах, а с това и пермеабилитета на митохондриалните мембрани, освобождаването на цитохром С, активирането на каспазната каскада и митохондриалния път на апоптозата (Luo X., 1998). Данни от литературата показват, че tBid протеинът може да индуцира освобождаване на цитохром С и клетъчна апоптотична смърт както и по механизъм независим от Вах експресията (Kim TH et al, 2000).

Вероятно активирането и на други апоптотични пътища, които не са включени в настоящото проучване, също може да предизвика клетъчната смърт. Установено е, че 4-HNE медира Fas-индуцираната апоптоза чрез активиране на JNK и p53 медирания митохондриален път на апоптозата (Chaudhary P et al, 2010). Съществуват доказателства, че активирането на стрес-киназия JNK път също може да предизвика апоптоза при ТТ (Marshall AH et al, 2013).

Данните от настоящият експеримент показат, че мелатонинът повишава експресията на ключовия анти-апоптотичен Bcl-2 протеин в СЕК, намалява Вах/Bcl-2 индекса и броя на апоптотичните клетки мв черния дроб (5.4). Анти-апоптотичният Bcl-2 протеин, локализиран в митохондриите инхибира ROS-индуцираната

апоптоза (Takushi T et al., 2006) Следователно, мелатонинът, притежаващ антиоксидантна активност променя баланса Bcl-2/Bax към протективен ефект – оцеляването на клетката. Мелатонинът има модулиращото действие върху експресията на апоптогенните протеини и при други патологични състояния (Jaworek J et al, 2012).

Повишеният брой на апоптотичните клетки в черния дроб корелира с дисфункцията му, докато протективният ефект на мелатонина е представен чрез редица биохимични тестове, отразяващи подобряването на чернодробната функция при термична травма. Данните от настоящото изследване съответстват на резултатите на други автори, които установяват, че мелатонинът инхибира апоптозата при други модели на чернодробно увреждане, индуцирано от исхемия /реперфузия (Wang XH et al, 2008), инфекции като малария (Guha M et al., 2010) и хеморагичен вирус (Tunnon MJ et al., 2011), както и в други органи включително и в стомашната мукоза (Maity P et al., 2009).

Нашите данни показват, че мелатонинът ограничава 4-HNE-медираното оксидативно увреждане и апоптозата в черния дроб. Мелатонинът като антиоксидант и „прихващач“ на свободните радикали също повишава нивото на глутатион и експресията и активността на GSH- свързаните ензими като GCL, GPx и GR. Мелатонинът предотвратява инхибирането на глутатион S-трансферазата (GST), която участва в неутрализирането на 4-HNE (Zavodnik I et al., 2011).

Мелатонинът като директен и индиректен антиоксидант вероятно намалява нивото на 4-HNE в митохондриите и ограничава увреждането на митохондриалните мембрани. Дефицитът на глутатион повишава оксидативния стрес, митохондриалната дисфункция, намалява продукцията на ATP и стимулира клетъчната смърт. Повишаването на синтеза на глутатион и поддържането на глутатионовата хомеостаза от мелатонина има важна роля в инхибиране на оксидативния стрес и апоптозата (Lu SC, 2013). Освен това мелатонинът взаимодейства с липидния бислой и стабилизира вътрешната митохондриална мембрана (Andrabi S., 2004; Rivas I et al., 2004; Leon et al., 2005; Lopez A et al., 2009, Paradies G et al., 2010; Асуña Castroviejo D et al., 2011).

Мелатонинът подобрява също електронния транспорт в дихателната верига, повишава продукцията на ATP и активността на MnSOD и намалява продукцията на MDA в митохондриите (Luchetti F et al, 2010; Yang Y et al, 2013). Мелатонинът намалява нивото на Ca^{2+} в митохондриите и ограничава опасното редуциране на мембранния потенциал (Salie et al, 2001; Dobsak et al, 2003).

Предполага се и алтернативен механизъм - мелатонинът по рецепторен (MT1/MT2) път да потиска апоптозата като инхибира активирането стрес-киназния JNK път (Radogna F et al, 2008; Lanoix D et al, 2012)(фиг 4.6.1).

Данни публикувани в литературата показват, че активирането на транскрипционният фактор Nrf2 и на HO-1 ограничава оксидативния стрес и потиска митохондриалния апоптотичен път (Soares MP et al, 2002; Nakao A et al., 2006; Wang X et al., 2007; Chen X., 2014). Анти-апоптотичното действие на HO-1 се медира предимно от CO, за който е известно, че стимулира ранната експресия на анти-апоптотичния Bcl-2 и потиска експресията на про-апоптотичния Bax протеин в ендотелните клетки (Nakao A et al., 2003). CO самостоятелно или в комбинация с другите продукти на HO-1 (билирубин и феритин) протектира ендотелните клетки от апоптозата, индуцирана от ROS (Leffler CW et al., 2011; Balla J et al., 2005). CO предотвратява също TNF α -индуцираната апоптоза на ендотелните клетки при опити *in vivo* като този ефект вероятно се медира чрез p38 MAPK (Brouard S et al., 2000). Протекцията на мелатонина срещу индуцирания от ТТ оксидативен стрес и апоптозата в черния дроб вероятно е медиран от активирането на Nrf2, повишаващ синтеза на редуцирания глутатион и антиоксидантната защита. Възможен механизъм за ограничаване на апоптозата е потискане експресията на TNF- α и NF κ B- медирания възпалителен отговор от мелатонина.

С настоящото проучване се прибавят нови данни за механизмите на клетъчна смърт в черния дроб, както и за анти-апоптотичния и хепатопротекторен ефект на мелатонина в ранния период след ТТ. Има данни в литературата за модулиращото действие на мелатонина върху експресията на апоптотичните протеини и при други патологични състояния (Jaworek J et al., 2012).

Получените резултати от настоящото изследване не показват значими промени в K67 пролиферативния маркер след ТТ в сравнение с контролната група (фиг.6.4). Те се различават от данните на други автори за повишена пролиферация на клетките на втория ден след експериментална ТТ (Jeschke MD et al., 2001). Вероятно по-късният период на тези изследвания и различията в експерименталните модели на термична травма, може да обясни разликата в резултатите. Приложеният мелатонин повишава на експресията на Ki67 пролиферативния маркер до недостоверни различия с тази в животните с ТТ. Резултатите от настоящото изследване показват, че мелатонинът потиска апоптоза на

синусоидалните клетки, но слабо стимулира тяхната пролиферация в острия период след ТТ.

Резултатите от проведеното проучване позволяват да се заключи, че оксидативният стрес, индуциран от ТТ е един от важните механизми за апоптозата в черния дроб (основно на СЕК и хепатоцити) при ТТ. Анти-апоптотичното действие на мелатонина се реализира чрез: 1). ограничаване на липидната пероксидация и акумулирането на 4-HNE, увреждащ митохондриалните мембрани; 2). повишаване на експресията на анти-апоптотичния Bcl-2 протеин и модулиране на съотношението про- и анти-апоптотични протеини; 3) потискане експресията на TNF- α и NF- κ B-медиирания инфламаторен отговор; 4) стимулиране на антиоксидантната защита чрез активиране на Nrf2; 5) повишаване активността на ензима HO-1, показващ антиоксидантно, анти-възпалително и анти-апоптотично действие.

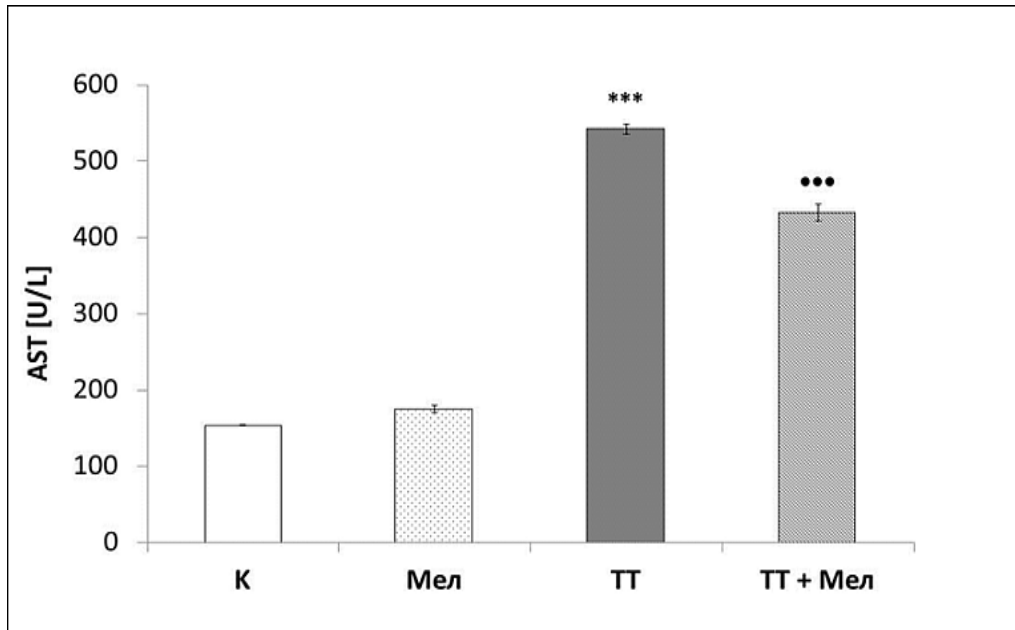
4.7.Изследване на чернодробната дисфункция в острия период след термична травма и ролята на мелатонина като хепатопротектор

Ефектът на мелатонина върху чернодробната дисфункция при ТТ е оценен чрез определяне активността на ензимните маркери на увреждането на черния дроб като аспартат аминокотрансфераза (AST), аланин аминокотрансфераза (ALT), гама глутамил трансфераза (GGT) и холинестераза (ChE), а също и нивото на албумин, билирубин и феритин, както и чрез хистологични изследвания.

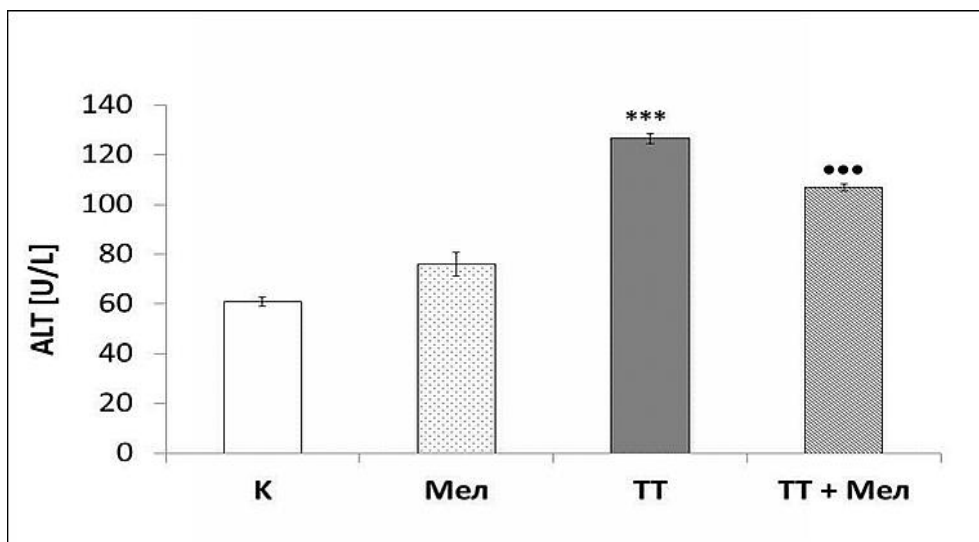
4.7.1. Активност на чернодробните трансаминази и на гама-глутамилтрансферазата в плазмата

Активността на аминотрансферазите (ALT и AST) нараства от 2,5 до 3 пъти ($p < 0.001$) съответно в групата с ТТ, когато се сравни с тази на контролната група. Мелатонинът намалява сигнификантно повишената активност на чернодробните трансаминази съответно за AST с 76% ($p < 0.001$) и за ALT с 79% ($p < 0.001$), но стойностите им остават достоверно по-високи от тези на контролната. (Фиг 7.1.1 и 7.1.2).

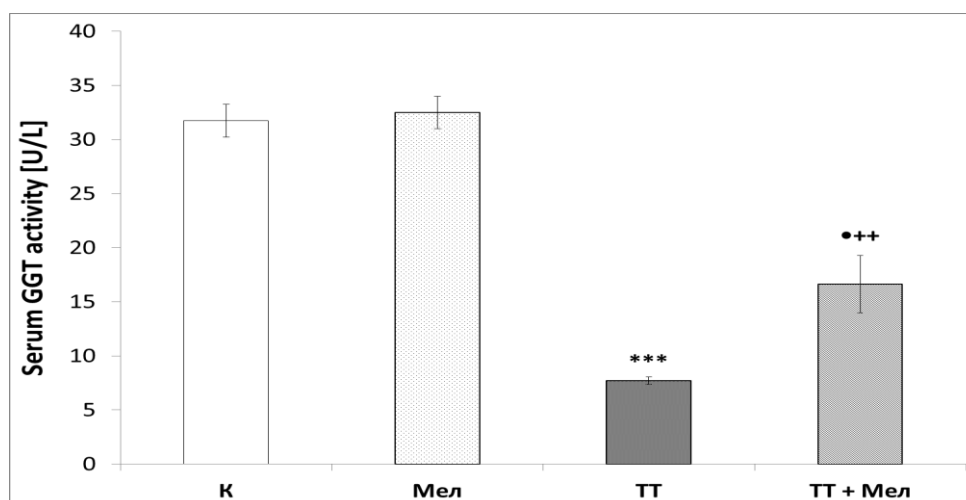
Плазмената GGT активност намалява с 76% ($p < 0.001$) в ТТ групата в сравнение с тази на контролната група (Фиг. 7.1.3). Мелатонинът повишава активността на GGT с 48% ($p < 0.001$) в сравнение с тези в ТТ група и достига до контролните стойности на 24 h след ТТ. Активността на ALT и AST на GGT в групата контролни животни третирани с Мел не се различава достоверно от тази на контролната група.



Фигура 7.1.1. Ефект на мелатонина (10мг/кг) върху активността на AST в плазмата на 24 h след ТТ. Контролни животни, $n=7$ (A), с ТТ $n=12$ (B) в групата ТТ+Мел, $n=12$ (C). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** $p < 0.001$ спрямо стойностите на контролната група; *** $p < 0.001$ спрямо стойностите на ТТ група.



Фигура 7.1.2. Ефект на мелатонина (10мг/кг) върху плазмената активност на ALT на 24 h след ТТ. Контролни животни, n=7) (A), с ТТ n=12 (B) в групата ТТ+Мел, n=12 (C) Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** p<0.001 спрямо стойностите на контролната група; *** p<0.001 спрямо стойностите на ТТ-групата.

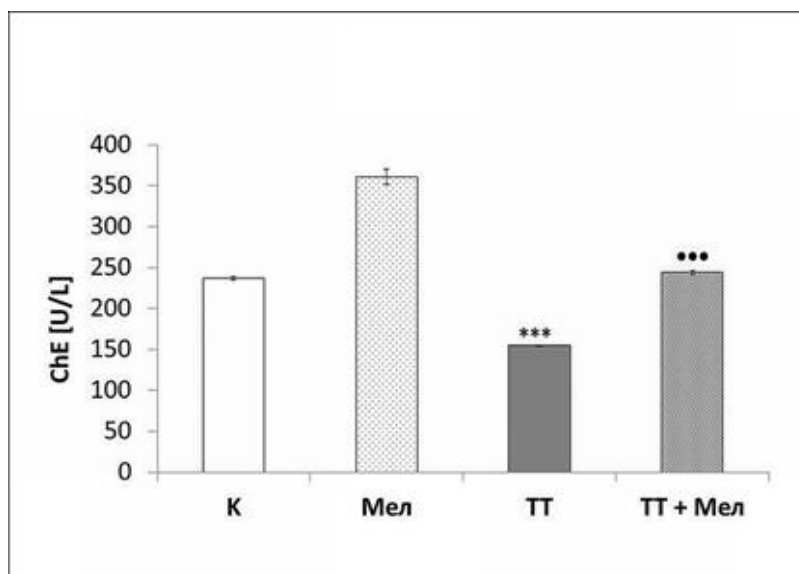


Фигура 7.1.3. Ефект на мелатонина (10мг/кг) върху серумната активност на гама-глутамилтрансферазата (GGT) на 24h след ТТ. Контролни животни, n=7) (A), с ТТ n=12 (B) в групата ТТ+Мел, n=12 (C). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** p<0.001спрямо стойностите на контролната група *** p<0.05 спрямо активността на ензима в ТТ група; ++p<0=01 спрямо активността на ензима в контролната –групата

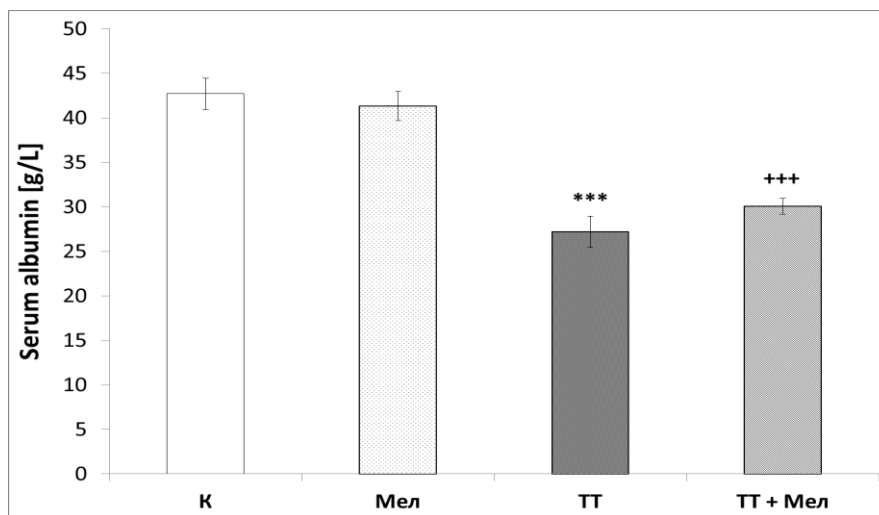
4.7.2. Активност на ензима холинестеразата (ChE) в плазмата и на плазмения албумин

Активността на ензима холинестераза (ChE) намалява с 36% ($p < 0.001$) след ТТ спрямо тази на контролната група (Фиг. 7.2.1). Мелатонинът повишава плазмената активност на ChE след термовъздействие с 59% ($p < 0.001$) и достига до стойности близки до тази на контролната група.

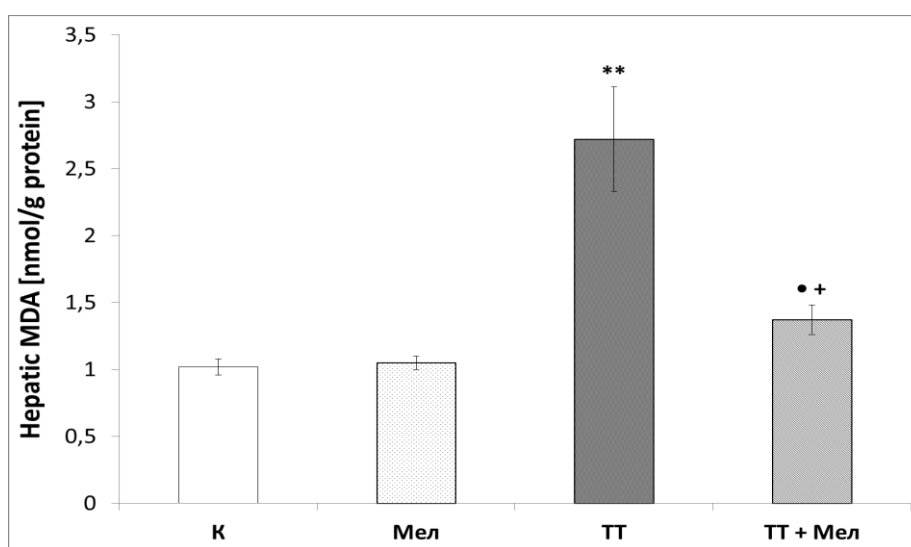
Концентрацията на плазмения албумин намалява с 37% ($p < 0.001$) спрямо това на контролната група. Мелатонинът повишава (недостовърно) концентрацията на албумините спрямо това на ТТ група. (фиг.7.2.3). В интактните животни третирани с мелатонин нивото на плазмените албумин, хепаталните протеини и плазмената активност на ChE са близки до тези на контролната група.



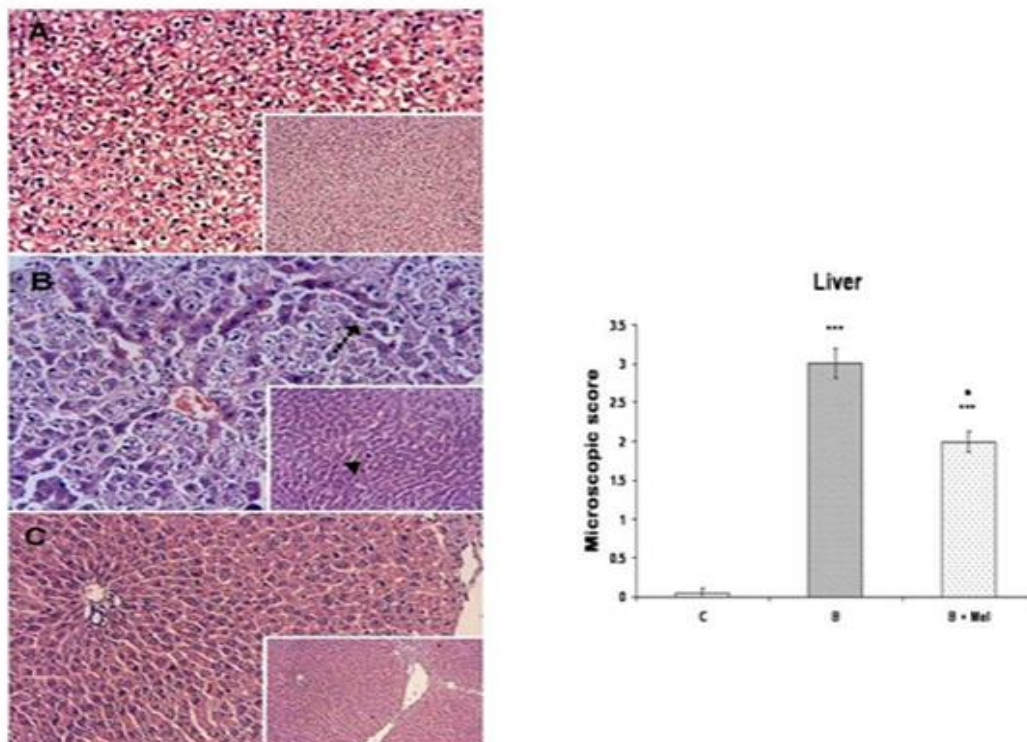
Фигура 7.2.1. Ефект на мелатонина (10 mg/kg) върху серумната холинестеразна активност при термична травма. Контролни животни, ($n=7$), Мел ($n=7$), ТТ-термична травма ($n=12$) в групата ТТ+Мел ($n=12$). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** $p < 0.001$ спрямо стойностите на контролната група; ** $p < 0.001$ спрямо активността на ензима в ТТ групата.



Фигура 7.2.3. Ефект на мелатонина (10 mg/kg) върху концентрацията на албумин в плазмата при термична травма. К (n=7); Мел (n=7), ТТ (n=12) ТТ+Мел, n=(12). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. *** p<0.001 спрямо стойностите на контролната група; p<0.001 спрямо стойностите на ТТ група (p<0.01) след ТТ.



Фигура 7.2.4. Ефект на мелатонина (10 mg/kg) на върху нивото на MDA nmol/g протеин в чернодробен хомогенат при термична травма. Контроли (К), n=8), Мел (n=8), ТТ, (n=8); ТТ+Мел, (n=8). Данните са представени като средна стойност+средна грешка на средната стойност. **p<0.001 спрямо стойностите на контролната група; +p<0.01 спрямо стойностите на контролната група; · p<0.01 спрямо стойностите на ТТ група. + p<0.01 спрямо стойностите на К групата.



Фигура 7.2.5 . Хистологично изследване (Original magnification, 400. H & E x 400) и морфометричен анализ Хепатоцитите са с нормална форма и големина и везикуларни ядра в контролната група (Фиг 7.2.5, А). В групата с ТТ хепатоцитите са с нарушена структура, с ацидофилна дегенерация и вакуолизация на хепатоцитите, (фиг 7.2.5, В). Хепатоцитите са с относително запазени структура в групата ТТ на животните на след прилагане на мелатонин (ТТ+Мел) (фиг 7.2,5,С).

4.7.3. Обсъждане

Остро настъпващата дисфункция на органите е едно от тежките усложнения и причина за високия морбидитет при пострадали с термични увреждания на кожата (Dehne MG et al., 2002; Jeschke MG et al., 2002; Horton JW, 2003; Maldonado M et al., 2007). Термичната травма предизвиква активиране на имунната система и системен възпалителен отговор и увреждане на органи, отделени от мястото на термичното увреждане.

Черният дроб е един от най-засегнатите органи поради важната му роля в ранния системен инфламаторен отговор, хиперкатаболизма и хемостазата при пострадали от ТТ (Jeschke MG et al., 2001; Klein D et al., 2004). Освобождаването на „алармини“ (про-инфламаторни цитокини, липидни пероксиди при

структурата на черния дроб в ранния период след термичната травма. Резултатите от настоящото изследване и данните на други автори показват, че неконтролираната продукция на цитотоксични цитокини и липидни пероксиди и неадекватната антиоксидантна защита, предизвикващи оксидативни увреждания, съдовото възпаление, ендотелна микроциркулаторна дисфункция са основни патофизиологични механизми на чернодробното увреждане и апоптозата в черния дроб при ТТ (Фиг 7.3) (Ding HQ et al., 2002, Vinha PP et al., 2004; Jeschke et al., 2007; Levin G & Egorihina MN, 2010).

Плазмената активност на трансаминазите (AST и ALT), един от най-чувствителните маркери на хепатално увреждане, се повишава значително (Фиг.7.1) и тези промени кореспондират с повишаване нивото на про-инфламаторните медиатори (TNF α , IL-6 и CRP), продуктите на липидната пероксидация (МДА и 4 HNE). Установените промени в плазмената активност на ензимите ALT и AST съответстват на резултатите от изследвания на други автори в ранния период след ТТ (Fang WH , 2002; Chen XL, 2005; Iseri SO et al, 2008; Sun BW et al, 2008). Мелатонинът само ограничава повишената ALT и AST активност, но тя остава по-висока от тази на контролната група, което показва участието вероятно и на други механизми за увреждане на клетките в черния дроб.

За разлика от плазмените трансаминази (ALT и AST), които са неспецифични индикатори на чернодробното увреждане, които отразяват и увреждането на миокарда и мускулната тъкан, ензимите ChE и GGT са маркери на чернодробната дисфункция, но литературните данни за тези ензими са оскъдни при ТТ (Jeschke MG et al, 2002). Резултатите от настоящото проучване показват, че плазмената активност на чернодробните ензими гама-глутамилтрансфераза (GGT) и холинестераза (ChE) намалява след термична травма (фиг 7.1.3, фиг. 7.2.1).

Ензимът GGT играе съществена роля в поддържане на хомеостазата на глутатиона и традиционно се счита като компонент на клетъчната защитна система срещу оксидативен стрес (Zhang H et al, 2005). Намаленото ниво на глутатион респ. на тиолови групи повишава чувствителността на клетките в черния дроб и на другите органи към оксидативно увреждане. При оксидативно увреждане на черния дроб намалява активността на глутатион пероксидазата (GPx), ензим от глутатионовата система (Toklu HZ et al, 2006; Sakarcan A et al, 2005). Предполагаме, че ниската концентрация на глутатион, дължаща се вероятно и на понижената активност на гама-глутамилтрансфераза при ТТ (Zhang H et al, 2003), намалява

защитата на черния дроб срещу свободните радикали, което от своя страна може да предизвика нарушения в редокс-баланса, митохондриална дисфункция и повишаване на апоптозата на СЕК и хепатоцитите.

Мелатонинът индуцира експресията на ензима глутамат цистеин лигаза (GCL), скорост определящ ензим в синтеза на глутатион (Urata Y, 1999). От друга страна мелатонинът ограничава понижаването на нивото на T-SH и на чернодробния глутатион, както и на оксидативно увреждане на черния дроб в острия период след ТТ (Sener G et al, 2002). Мелатонинът вероятно по този начин нормализира GGT активност и допринася за подобряване на антиоксидантната защита и чернодробната функция в острия период след ТТ.

При физиологични условия черният дроб синтезира основно конститутивни хепатални протеини като албумин, преалбумин и трансферин. Получените от нас резултати показват повишаване нивото на остро-фазните белтъци (CRP и фибриноген) и намаляване синтеза на конститутивни белтъци в черния дроб, което е в съответствие с уставеното от други автори „преориентиране” на черния дроб към синтез основно на остро-фазните белтъци и цитокини в ранния период след ТТ (Jeschke MG et al, 2000). Повишената експресия на транскрипционния фактор NF- κ B и на про-инфламаторни цитокини (IL-6 и TNF- α) е възможен механизъм за повишения катаболизъм в черния дроб при ТТ (Jeschke MG et al, 2001; Keck, M, 2009; Jang Q, 2012).

Резултатите от настоящото изследване показват понижаване нивото на серумния албумин (фиг 7.2.3). Други автори установяват намалено съдържание не само на албумин, но и на други конститутивни протеини като трансферин и церулоплазмин в плазмата в острия период след ТТ (Jeschke MG, 2009). Плазменият албумин изпълнява важни физиологични функции като регулиране на колоидо-осмотичното налягане, транспортиране на хормони, мастни киселини лекарства и метаболити, регулиране на мембранния пермеабилитет. Албуминът притежава антиоксидантна, анти-възпалителна и анти-тромботична активност (Prajapati KD et al., 2011). Намаленото ниво на конститутивните белтъци вероятно се дължи на намаления им синтез в черния дроб и доказателство за това е намалената активност на ензима хорлинестераза, отразяващ синтетичната функция на черния дроб (Kamoliz LP et al., 2002). Подобен извод се подкрепя и от данните на други автори, изследващи промените във функционалната активност на черния дроб при ТТ (Jeschke MG et al., 2002, 2009). Освен това, промените

в холинестеразата и про-инфламаторните цитокини в плазмата са включени в комплекса от показатели за оценка прогнозата при пациенти с ТТ (Marko P et al., 2003).

Мелатонинът ограничава повишаването на нивото на про-възпалителните цитокини, остро-фазните белтъци и MDA в плазмата в острия период след ТТ. Мелатонинът протектира черния дроб срещу оксидативно увреждане и този ефект най-вероятно е свързан с потискане на медиацията от NF- κ B про-възпалителен отговор. Освен това, мелатонинът повишава плазмената ChE активност, както и нивото на чернодробните протеини, но не променя статистически достоверно концентрацията на серумния албумин в острия период след ТТ. Този резултат не е изненадващ, тъй като нивото на серумния албумин намалява не само поради намаляване на синтетичната функция на черния дроб, но и в резултат от загубата на албумини, поради повишената капилярна пропускливост (Jeschke MG et al., 2009) и микроалбуминурията при ТТ (Vlachou E et al., 2008).

Представяйки хипотезата, че намаляването на нивото на остро-фазните белтъци и повишаването на конститутивните белтъци ограничава увреждането на чернодробния паренхим и подобрява чернодробната функция, много вероятно е мелатонинът чрез този механизъм да оказва хепатопротективен ефект при ТТ..

Повишената продукция на цитотоксичните алдехиди (MDA и 4-HNE) и дисбалансът между про- и анти-възпалителни цитокини в черния дроб вероятно са основни механизми за хистопатологичните изменения в черния дроб, включващи хепатоцелуларна вакуолизация и оточност на хепатоцитите и наличие на апоптотични клетки (Фиг.6.4). Мелатонинът намалява броя на апоптотичните клетки и ограничава хистопатологичните промени в черния дроб при ТТ. Цитопротективният ефект на мелатонина при термична травма се свързва със способността му да намалява продукцията на про-възпалителни цитокини и на липидни пероксиди, да ограничава понижаването на T-SH ниво, да подобрява редокс-потенциала и функционалната активност на клетките в черния дроб.

Резултатите от нашето проучване позволяват да се заключи , че увреждането на черния дроб се дължи на няколко взаимно-свързани патофизиологични механизми като активиране на оксидативния стрес, липидната пероксидация, възпалението и небалансираната антиоксидантна защита, на ендотелната дисфункция и нарушенията в хемореологичните свойства на кръвните клетки и микроциркулацията в острия период след ТТ. Чрез своеобразното съчетаване на антиоксидантен, анти-

възпалителен и анти-апоптотичен ефекти, мелатонинът ограничава хистопатологичните изменения и чернодробната дисфункция в острия период след ТТ. Освен това, мелатонинът притежава седативен и хронобиологичен ефекти, които го правят още по-атрактивно средство за терапия на пострадалите от термичната травма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящата работа представлява първото по рода си целенасочено комплексно проучване върху възможните патофизиологичните механизми на увреждане на черния дроб при термична травма, свързани с развитието на оксидативния стрес. Резултатите от проведените изследвания представляват убедителни доказателства за ролята на мелатонина като мощен ендогенен протектор срещу индуцираното от термичната травма увреждане на черния дроб. За разлика от другите известни антиоксиданти, които неутрализират ROS и увреждащото им действие върху антиоксидантните ензими, приложеният мелатонин стимулира синтеза на антиоксидантни ензими и повишава антиоксидантната защита. Промените в експресията на антиоксидантни ензими не са еднопосочни. Нашите данни показват, че мелатонинът повишава експресията на ензима HO-1, но не и на другият не по-малко важен антиоксидантен ензим Cu/ZnSOD в цитоплазмата. Остава отворен въпросът как се променя експресията на MnSOD, локализирана в митохондриите под действие на ТТ и мелатонина. Този проблем изисква допълнителни проучвания и е от съществен интерес при планиране на нашите бъдещи разработки.

Поради високата си липофилност мелатонинът може лесно да преминава през мембраните на клетките и да попада в субклетъчните структури (митохондриите) и по рецепторно-независим път и да действа като универсален антиоксидант и активатор на цитопротективните пътища.

Резултатите от настоящото проучване показват, че мелатонинът потиска повишения възпалителен отговор, повишавайки нивото на анти-възпалителните и намалявайки това на про-инфламаторните медиатори, което ограничава нарушенията в структурата и функцията на черния дроб и стимулира възстановителните процеси след ТТ. Мелатонинът потиска

апоптозата на СЕК, като корегира дисбаланса между про-/ и анти-апоптотични протеини с превалиране на последните.

През последните години бе доказано, че свободните радикали при определени условия изпълняват важната роля на ROS като сигнални молекули, участват в клетъчната сигнализация чрез регулиране активността на транскрипционни фактори. С настоящото проучване се доказва, че мелатонинът директно повлиява експресията на NF- κ B, модулиращ инфламаторния отговор, както и на другия транскрипционен фактор Nrf2, който регулира експресията на хем-оксигеназа-1. За пръв път се доказва, че мелатонинът повишава експресията на ензима хем-оксигеназа-1 и ограничава чернодробното тъканно увреждане, индуцирано от оксидативния стрес и инфламаторните медиатори при ТТ.

Способността на мелатонина да повишава експресията на антиоксидантния ензим HO-1 и на транскрипционния фактор Nrf2 и паралелно с това да намалява експресията на транскрипционния фактор NF- κ B и на про-инфламаторните медиатори IL-6 и TNF- α и CRP, разкрива неговия потенциал като надежден терапевтичен агент при ограничаване увреждането на структурата и функцията на черния дроб, индуцирани от ТТ. Протективният ефект на мелатонина върху черния дроб се свързва с повишаване на експресията на eNOS и потискане на NF- κ B-медираните процеси на ендотелна дисфункция и свързаните с тях тромбоцитна агрегация и хиперкоагулация. Този многопластов ефект на мелатонина определя неговото хепатопротекторно действие.

Доказването на протективния ефект на мелатонина върху патофизиологичните механизми на чернодробно увреждане при ТТ е сериозен принос при оценката на ролята му върху: (1) хем-оксигеназата-1 като плеотропен ензим със защитно действие; (2) Nrf2, повишаващ антиоксидантния капацитет; (3) NF- κ B и неговото модулиращо действие върху инфламаторния отговор и апоптозата в черния дроб.

Данните от нашите проучвания относно ролята на основните транскрипционни фактори, модулиращи инфламаторния и апоптотичен отговор и повишаващи антиоксидантната защита при ТТ могат да послужат като база за бъдещи проучвания на механизмите на тъканното увреждане и при други патологични състояния.

В заключение, резултатите получени от това изследване разкриват потенциала на мелатонина като плеотропен фактор с изразено хепатопротекторно действие и перспективи за бъдещото му използване самостоятелно и в комедикация при пациенти с ТТ,

даже и при пациенти със сериозни съпътстващи травмата заболявания.

ИЗВОДИ

1. Термичното увреждане на кожата повишава оксидативния стрес и мобилизира антиоксидантната защита в черния дроб като повишава експресията на Cu/Zn супероксиддизмутаза, нивото на липид-пероксидните продукти (малондиалдеhid и 4-хидроксиноненал и намалява концентрацията на тоталните тиоли при ТТ.
2. Термичната травма активира пероксидативните процеси в плазмата като повишава нивото на MDA и намалява нивото на тотални тиоли и пикочна киселина.
3. Мелатонинът предотвратява индуцирано от ТТ оксидативно увреждане в черния дроб чрез :
 - намаляване нивото на 4-хидроксиноненала и на малондиалдехида в черния дроб.
 - повишаване експресията на ензима хем-оксигеназа-1 в черния дроб, притежаващ антиоксидантен потенциал;
 - повишаване нивото на тоталните тиоли в черния дроб.
4. Термичната травма индуцира системен възпалителен отговор като повишава нивото на CRP и на про- възпалителните цитокини (TNF α и IL-6) без да променя нивото на анти- възпалителните цитокин (IL-10) в плазмата и чернодробен хомогенат.
5. Мелатонинът намалява нивото на про-възпалителните и повишава това на анти- възпалителните цитокини, възстановява баланса между тях, подобрява чернодробната функция и корегира структурните промени след ТТ.
6. Мелатонинът потиска NF-kB-медиирания възпалителен отговор и протектира срещу индуциранот от ТТ-чернодробно увреждане
7. Термичната травма стимулира развитието на ендотелна дисфункция като:
 - потиска експресията на ендотелната NO-синтаза;
 - повишава образуването на тромбоцитни агрегати;
 - намалява тромборезистентността на ендотела (повишава протромбиновата активност и нивото на CRP и фибриногена).

- влошава флексибилитета на еритроцитите.
8. Мелатонинът повишава експресията на вазоактивните ензими eNOS и HO-1 и флексибилитета на еритроцитите и корегира ендотелната дисфункция при ТТ.
 9. При термичната травма се повишава експресията на хем-оксигеназа-1, притежаваща антиоксидантен, анти-инфламаторен и анти-апоптотичен ефект.
 10. Повишената експресия на HO-1 под действие на мелатонина е нов механизъм за протекция от страна на мелатонина срещу хепаталното увреждане при ТТ.
 11. Мелатонинът стимулира експресията на транскрипционния фактор NrF2 и антиоксидантния защитен механизъм, свързан с повишаване експресията на HO-1 и IL-10, протектиращи черния дроб срещу увреждане, индуцирано от ТТ.
 12. Мелатонинът потиска апоптозата на синусоидалните ендотелни клетки и хепатоцитите при ТТ като :
 - потиска експресията на про-апоптотичния BAX протеин;
 - стимулира експресията на анти-апоптотичния Bcl-2 протеин;
 - модулира про- /анти апоптотичния баланс и намалява BAX /Bcl-2 индекс;
 - намалява броя на апоптотичните телца в черния дроб.
 13. Термичната травма предизвиква дистрофични промени в чернодробната архитектура и чернодробна дисфункция, проявена чрез:
 - повишаване плазмената активност на аспартат- и аланин- аминотрансминазите;
 - намаляване синтеза на конститутивни белтъци (албумин);
 - повишаване на синтеза на остро-фазните белтъци (CRP и фибриноген);
 - намаляване на активността на гама глутамил трансфераза и холинестераза в плазмата;
 - повишаваНЕ протромбиновото време и нивото на фибриногена.
 14. Мелатонинът ограничава дегенеративните изменения в черния дроб, но слабо стимулира клетъчната регенерация в синусоидалните ендотелни клетки в черния дроб в ранния период след ТТ.
 15. Мелатонинът повлиява чернодробната дисфункция, като:

- понижава плазмената активност на аспартат- и аланин аминокислот-трансферазите;
 - нормализира активността на гама глутамилтрансфераза и холинестераза в плазмата;
 - намалява нивото на остро-фазните белтъци- С-реактивен протеини фибриноген);
 - потиска хиперкоагулация при ТТ.
16. Мелатонинът повишава експресията на ензима хем-оксигеназа-1 ограничава оксидативните нарушения в и модулира експресията на про- апоптотичните Bax и анти-апоптотичните Bcl-2 протеини и намалява Bax/ Bcl-2 индекс
 17. Ефектът на мелатонина да повишава експресията на антиоксидантния ензим HO-1, паралелно с намаляване на медиаторите на възпалението и NF-kB, разкрива неговия потенциал да повишава антиоксидантната защита чрез активиране на транскрипционния фактор Nrf2 и паралелно с това да редуцира инфламаторния отговор чрез потискане на транскрипционния фактор NF-kB.
 18. Резултатите от настоящото проучване са начален етап при изследване на транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB като нов клас терапевтични таргети за ограничаване тъканното увреждане при ТТ.

СПРАВКА ЗА ОЧАКВАНИТЕ ПРИНОСИ

1. Настоящата работа представлява първото по рода си целенасочено комплексно изследване на дисбаланса между про- и анти-оксиданти, про- и анти-възпалителни, про- и анти-апоптотични фактори с цел проучване на патофизиологичните механизми на чернодробното увреждане при ТТ.
2. За първи път системно се проучва влиянието на мелатонина при увреждане на черния дроб чрез изследване на маркери за оксидативен стрес (оксиданти и антиоксиданти), за възпаление (про-/анти-възпалителни) и, апоптоза (про-/анти-апоптотични) при ТТ.
3. Доказва се по безспорен начин, че протекторният ефект на мелатонина в черния дроб е свързан с повишаване на активността на ензима хем-оксигеназа-1, притежаващ

- антиоксидантно, анти-възпалително и анти-апоптотично (плеотропно) действие.
4. Изяснява се ролята на транскрипционния фактор NF-kB и неговото модулиращо действие върху възпалителния отговор в черния дроб при ТТ .
 5. За първи път е доказано, че мелатонинът протектира черния дроб от увреждане, индуцирано от ТТ чрез потискане на NF-kB- медиацията възпалителен отговор.
 6. Доказа се потискащия ефект на мелатонина върху апоптозата на синусоидалните ендотелни клетки и хепатоцитите в острия период след ТТ.
 7. За пръв път се изследва транскрипционния фактор Nrf2, регулиращ експресията на хем-оксигеназата и повишаване нивото на експресията му от мелатонина при експериментален модел на ТТ.
 8. Изградена е хипотеза за ролята на възпалителните и оксидативни механизми и връзката между тях в комплексния патофизиологичен отговор при ТТ.
 9. Получени са убедителни научни доказателства, че мелатонинът чрез активиране на Nrf2, повишава антиоксидантния капацитет, потиска възпалението и ограничава чернодробното увреждане, индуцирано от ТТ.
 10. Проучванията върху промяната в активността на транскрипционните фактори NF-kB и Nrf2 са добра основа за бъдещи изследвания върху патофизиологичните механизми на тъканните увреждания и при други патологични състояния .

Практическите ползи от проучването са свързани със следното:

1. Изследванията на ефектите на мелатонина върху антиоксидантната защита, оксидативния стрес, възпалението и микроциркулаторната дисфункция, апоптозата и регенерацията е важен аспект при изучаване ролята му в механизмите, протектиращи черния дроб и бъдещо използване като терапевтично средство за подобряване на чернодробната дисфункция при ТТ.
2. Изследването на транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB дава по-достоверна и глобална представа за патофизиологичните механизми на тъканно увреждане, в сравнение с изследване само на отделни маркери на оксидативен стрес, възпаление и апоптоза.

3. Настоящото проучване посочва пътя на бъдещите терапевтични подходи, насочени към въздействие, основно върху транскрипционните фактори Nrf2 и NF-κB, които регулират експресията на много гени на увреждащи и защитни фактори.
4. Комплексът от представените в проучването методи може да бъде ефективно приложен като иновативен в клиничната практика при диагностициране на тъканното увреждане при различни заболявания.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Bekyarova G**, Tzaneva M, Hristova M, Hristov K. Melatonin protection against burn-induced liver injury. A review. CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE, 2014, 9(1), 148-158.
IF=0.264
2. **Bekyarova G**, Tzaneva M, Hristova M. Melatonin modulates the expression of Bcl-2 family proteins in liver after thermal injury in rats. ARCHIVE BIOTECHNOLOGY AND BIOSCIENCE, 2013, 4 (11A), 41-44
3. **Bekyarova G**, Tzaneva M, Hristova M. Heme Oxygenase-1 Expression in Gastric Mucosa and Liver after Burns: Preliminary Immunohistochemical Study. JOURNAL OF INTERDISCIPLINARY HISTOPATHOLOGY, 2013, 1 (5), 246-25
4. **Bekyarova G.**, Hristova M, Tsaneva M. Cytoprotective effect of melatonin and antioxidant defense after thermal skin injury. SCRIPTA SCIENTIFICA, MEDICA, 2012, 44(1), 33-39
5. **Bekyarova G**, Apostolova M, Kotzev I. Melatonin protection against burn-induced hepatic injury by down-regulation of nuclear factor kappa B activation. INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOL PHARMACOL, 2012, 25 (3), 591-596
IF=2.99
6. **Bekyarova G**, Bratchkova Y, Tancheva S, Hristova M. Effective melatonin protection in burn-induced liver disorders in rats. CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE, 2012, 7(4), 535-38
IF=0.264
7. **Bekyarova G**, Tancheva S, Hristova M. The effects of melatonin on burn-induced inflammatory responses and coagulation disorders in rats. METHODS FIND EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY, 2010, 32:299-303
IF=1.037

8. **Bekyarova G**, Tancheva S, Hristova M. Protective effect of melatonin against oxidative hepatic injury after experimental thermal trauma. *METHODS FIND EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY*, 2009 31(1):11-14.
IF=1.136
9. **Bekyarova G**, Galunska B, Ivanova D, Yankova T. Effect of melatonin on burn-induced gastric mucosal injury in rats. *BURNS*, 2009,35(6):863-878
IF= 1.95
10. **Bekyarova G**, Hristova M, Tancheva S, Galunska B, Ivanova D. Melatonin as factor restricting burn induced oxidative injury of liver. *SCIENTIFIC RESEARCH JOURNAL OF SOUNTH-WEST UNIVERSITY*, 2008, 1:13-16.
11. **Бекярова Г**, Христова М. Влияние на мелатонина върху оксидативния стрес и хемостазата при експериментална термична травма. Сб:III нац. конференция по проблемите на термичната травма и пластичната хирургия, Варна 2009, 20-27
12. **Bekyarova G**. "Melatonin protects against burn-induced oxidative injury in remote organs". The 32nd Balkan Medical Week 21-23 September 2012, Nis, Serbia ; Abstracts P 130

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА СТАТИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Bekyarova, G.** et al Protective effect of melatonin against oxidative hepatic injury after experimental thermal trauma. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2009, 31 (1), 11-14
IF =1.136
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.*2013;54(1),1-14
IF=7.304
- Mozaffari S, Abdollahi M. Melatonin, a promising supplement in inflammatory bowel disease: a comprehensive review of evidences. *Curr Pharm Des.* 2011;17(38):4372-8.
IF=3,870
- Zaitone, S., Hassan, N., El-Orabi, N., El-Awady, E.-S. Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non- alcoholic fatty liver disease. *European Journal of Pharmacology*,2011,662(1-3),70-77
IF=2.741

- Kell, D.B Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Archives of Toxicology*, 2010, 84 (11), 825-889.
IF= 5.215
- Al-Ghoul, WM., Abu-Shaqra, S, Park, BG., Nadeem F. Melatonin plays a protective role in postburn rodent gut pathophysiology. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(3), 282-293
IF= 3.436
- Tancheva, S. Towards the diagnostic of tubulo-interstitial bacterial nephritis Nephrology, *Dialysis and Transplantation* 2010,16 (2),9-17
IF=3.564
- Nwose, EU , Richards, RS. Management of stress and stress-related diseases: Emerging computer-based technologies and the rationale for clinical laboratory assessment .*North American Journal of Medical Sciences* , 2009; 1(6) 288-292.
- 2. **Bekyarova G**, et al. Effect of melatonin on burn-induced gastric mucosal injury in rats. *Burns*. 2009 ;35(6):863-8
IF=1.95
- Sahin I, Bilge D, Kazanci N, Severcan F. Concentration-dependent effect of melatonin on DSPC membrane. *Journal of Molecular Structure* 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.08.060>
IF=1.404
- Xue C, Chou CS, Kao CY, Sen CK, Friedman A. Propagation of cutaneous thermal injury: a mathematical model. *Wound Repair Regen*.2012;20(1):114-22.
IF= 2.75
- Xiu-jun EU Fang Y. Oxidative injury and antioxidant therapy in early stage of burns. *J Shanhai Jiaotong University*, 2010, 30(12), 1481-1485
- 3. **Bekyarova G et al** The effects of melatonin on burn-induced inflammatory responses and coagulation disorders in rats. *Methods Find Exp ClinPharmacol*. 2010;32(5):299-303.
IF=1.037

- Nduhirabandi F. The role of melatonin in cardioprotection: an investigation into the mechanisms involved in glucose homeostasis, microvascular endothelial function and mitochondrial in normal and insulin resistant state, *Dissertation, Stellenbosch University*, 2014.
- Nduhirabandi F, du Toit EF, lochner A. Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? *Acta Physiol (Oxford)*. 2012 ;205(2), 209-23
IF= 3.85
- Xue C, Chou CS, Kao CY, Sen CK, Friedman A. Propagation of cutaneous thermal injury: a mathematical model. *Wound Repair Regen*. 2012 ;20(1): 114-22
IF=2.757
- Arusshanian EB. Effect of melatonin on the thrombocyte hemostasis and its Circadian organization. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*2013;76(5),32-36.
IF=0.243
- Zhang Q Advances in the research of reological behavior of pletelets and its regulation after burns. *Chinese Journal of Burns* 2014, 30(1), 56-60.
- Fang Z Chen Q, Shihui Z Oxidative stress after burn injury and treatment strategies. *Chinese Medical Journal*, 2012
- Zhi G, Xuesheng W, Xiang SY. Severely scalded rt intestinal tissue oxidative stress. *Anhui medical University*, 2014
- 4. **Bekyarova G et al** Melatonin protection against burn-induced hepatic injury by down-regulation of nuclear factor kappa B activation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*25(3),591-596.
IF=2.99
- Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and ubiquitin: what's the connection? *Cell Mol Life Sci*. 2014 Jun 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID:
IF= 5.615
- Kalinichenko LS, Pertsov SS, Koplik EV. Melatonin effects on serum cytokine profiles of rats with different behavioral parameters in acute emotional stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*,2014,156(5),627-630.
IF=0.340
- Pohanka M. Impact of melatonin on immunity: a review. *Central European Journal of Medicine* , 2013, 8 (4), 369-37;
IF=0.262

- Korkmaz, G.G., Uzun, H., Cakatay, U., Aydin, S. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury *Clinical and Investigative Medicine* 2013, 35 (6) E370-E77
IF= 1.085
- Conti P. Impact of Cytokines in Mast cells Allergic Inflammation *International Trends in Immunity* 2013, 1(3) ISSN 2326-3121 (Print) ISSN 2326
- 5. **Bekyarova, G.**, Bratchkova, Y., Tancheva, S., Hristova, M. Effective melatonin protection of burn-induced hepatic disorders in rats. *Central European Journal of Medicine* 7 (4) , 533-538
IF=0.260
- Pohanka, M. Impact of melatonin on immunity: A review . *Central European Journal of Medicine* • 2013, 8 (4),369-376
IF=0.260