

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

---

**Д-р Ирина Илиева Пашалиева**

**МЕЛАТОНИН - ИНИЦИИРАНИ ЕФЕКТИ  
ВЪРХУ ПУСКОВИЯ МЕХАНИЗЪМ  
НА ХЕМОСТАЗАТА У ПЛЪХОВЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен ръководител**  
проф. д-р Негрин Негрев, д.м.н.

**Варна, 2015**

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

**Д-р Ирина Илиева Пашалиева**

**МЕЛАТОНИН - ИНИЦИИРАНИ ЕФЕКТИ  
ВЪРХУ ПУСКОВИЯ МЕХАНИЗЪМ  
НА ХЕМОСТАЗАТА У ПЛЪХОВЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Научна специалност „Физиология на животните и човека“

**Научен ръководител**  
проф. д-р Негрин Негрев, д.м.н.

**Официални рецензенти:**  
Чл.-кор. проф. д-р Радомир Радомиров, д.м.н.  
Проф. д-р Димитър Терзииванов, д.м.н.

**Варна, 2015**

Дисертационният труд е написан на 138 страници и съдържа 36 фигури и 4 таблици. Библиографската справка включва 365 заглавия, от които 16 на кирилица и 349 на латиница.

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по физиология и патофизиология към Медицински университет – Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....  
2015 г. от ..... часа в III аудитория (ет. 4) на Медицински университет – Варна, на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на Медицински университет – Варна.

# СЪДЪРЖАНИЕ

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО .....	9
Цел.....	9
Задачи.....	9
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	10
1. Експериментални животни и условия .....	10
2. Използвани вещества и дози .....	10
3. Структуриране на експерименталните групи и приложение на веществата.....	10
4. Получаване на плазма и съхраняване.....	11
5. Хистологично изследване .....	11
6. Хемостазни показатели .....	12
6.1. Интегрални показатели на хемостазата.....	12
6.2. Тромбоцити – брой и функционална активност.....	12
6.3. Фактор на von Willebrand.....	12
6.4. Тъканен фактор.....	13
6.5. Инхибитор на пътя на тъканния фактор.....	13
6.6. Статистически анализ на резултатите .....	13
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	14
1. Данни от скриниращо проучване на влиянието на мелатонина и лузиндола върху интегрални показатели на хемостазата.....	14
2. Ефекти на мелатонин и лузиндол върху броя, функционалната активност на тромбоцитите и плазменния фактор на фон Вилебранд.....	22
2.1. Ефекти върху броя на тромбоцитите.....	22
2.2. Ефекти върху функционалната активност на тромбоцитите .....	24
2.3. Ефекти върху плазменото ниво и активност на фактора на фон Вилебранд .....	30
3. Влияние на мелатонин и лузиндол върху тъканния фактор, плазменото ниво и активност на инхибитора на пътя на тъканния фактор.....	35

<b>4. Заключениено обсъждане.....</b>	<b>43</b>
ИЗВОДИ.....	49
НАУЧНИ ПРИНОСИ.....	50
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	52

## ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>M</b>	– мелатонин
<b>L</b>	– лузиндол
<b>aPTT</b>	– активирано парциално тромбoplastиново време
<b>PT</b>	– протромбиново време
<b>TT</b>	– тромбиново време
<b><math>\beta</math>-TG</b>	– $\beta$ -тромбоглобулин
<b>PF 4</b>	– тромбоцитен фактор 4
<b>vWF: Ag</b>	– фактор на фон Вилебранд, антиген
<b>vWF: CB</b>	– фактор на фон Вилебранд, капацитет за свързване на колаген
<b>TF: Ag</b>	– тъканен фактор, антиген
<b>Free TFPI: Ag</b>	– свободен инхибитор на пътя на тъканния фактор, антиген
<b>Free TFPI: Act</b>	– свободен инхибитор на пътя на тъканния фактор, активност



## ВЪВЕДЕНИЕ

Мелатонинът е уникална и универсална субстанция, едно от най-древните биохимични вещества. Той регулира биоритмите в живите организми и е представен още в бактерии, водорасли, гъби. Мелатонинът присъства в едноклетъчните организми и растенията, произвежда се и у бозайниците, включително у човека (D. Tan et al., 2003; M. Karasek, K. Winczyk, 2006; S. Pandi-Perumal et al., 2006, M. Dubocovich et al., 2010; R. Reiter et al., 2010). Идентифициран за първи път във волска епифизна тъкан, той е бил разглеждан изключително като хормон. По-нови данни допълват тази концепция. Някои характеристики го отличават от класическите хормони, например неговата директна, нерцепторно - медирана активност на чистач на свободни радикали. Тъй като хормонът се намира също в зеленчуци, плодове, ориз, пшеница и билки, от нутриционална гледна точка, той може да бъде класифициран като витамин. В последно време мелатонинът започва да се разглежда като антиоксидант, подобно на витамин в хранителната верига и в многоклетъчните организми, които го продуцират; той притежава автокоидни, паракоидни и хормонални свойства (D. Tan et al., 2003; R. Hardeland, 2012). Във всички живи организми, от растенията, през животните до човека и от едноклетъчните водорасли до хората показва циркаден ритъм на секреция (R. Jockers et al., 2008; Г. Литвиненко, 2010). У хора и у всички денонощни животни плазмените нива на мелатонина са високи по време на периода на сън, докато у нощните животни (такива са повечето от лабораторните животни) мелатониновите концентрации са високи по време на активния период, т.е. отново през нощта (R. Jockers, 2008). Хормонът на епифизата има многобройни биологични ефекти в организма на бозайниците, като доминират данните, свързани с неговата роля да предава информация за ежедневния цикъл светло-тъмно



(P. Delagrangue et al., 2003; B. Claustrat et al., 2005; M. Bailey et al., 2009; M. Dubocovich et al., 2010).

Въпреки изключително многобройните си и разнообразни функции в организма, все още за участието на мелатонина в процесите на хемостаза-та се знае твърде малко.

Известно е, че началото на кардиоваскуларните нарушения и венозния тромбоемболизъм, както и концентрацията и активността на някои протеини на коагулантната, антикоагулантната и фибринолитичните системи са подложени на циркадни колебания (R. van Diest et al., 2002; M. Pinotti et al., 2005; E. Haus, 2007; M. Montagnana et al., 2009; N. Takeda, K. Maemura, 2010; R. Hardeland et al., 2012). Намалената секреция на мелатонин с настъпване на светлата част от денонощието се разглежда като една от причините за повишен риск от тромботични усложнения у болни със сърдечно-съдова патология (Э. Арушанян, 2013). Съществуващите клинични данни обаче не изясняват до каква степен именно епифизата и мелатонинът участват в регулацията на тези денонощни колебания.

Макар и ограничен брой, налице са и експериментални проучвания за ролята на мелатонина върху хемостазата, чийто анализ е силно затруднен поради използването на различни животински модели и условия на провеждане на изследванията.

Данните от литературата аргументират необходимостта от осъществяване на фармако-физиологично проучване на ефектите на мелатонина върху хемостазата, приложен в ниски дози на интактни животни.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО**

### **ЦЕЛ**

Да се проучи влиянието на мелатонина върху пусковия механизъм на хемостазата у плъхове.

### **ЗАДАЧИ**

За постигане на целта бяха набелязани следните експериментални задачи:

1. Да се проучи влиянието на мелатонина и инхибитора на неговите рецептори – лужиндол, върху интегрални показатели на хемостазата.
2. Да се проучат ефектите на мелатонина и лужиндола както следва:
  - а) ефекти върху броя на тромбоцитите;
  - б) ефекти върху функционалната активност на тромбоцитите;
  - в) ефекти върху плазмения фактор на фон Вилебранд.
3. Да се проучи влиянието на мелатонина и лужиндола върху тъканния фактор и инхибитора на пътя на тъканния фактор.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ И УСЛОВИЯ

За целта на експерименталното проучване бяха използвани 156 бели мъжки плъха, порода Wistar, от които 117 опитни и 39 контролни. Плъховете бяха с тегло 200-220 g и отглеждани при стандартни условия, поставени на естествен режим светло – тъмно 12:12 часа, през месеците март и септември, за да се намали влиянието на тъмнината върху продукцията на мелатонин. Храненето се осъществяваше със стандартна храна и вода ad libitum. При работа с животните се спазваха изискванията на Европейската конвенция и Директивата на Европейския парламент за протекция на експериментални животни (Protection of animals used for experimental purposes, Council Directive 86/609/EEC of November 1986, Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of September 2010).

## 2. ИЗПОЛЗВАНИ ВЕЩЕСТВА И ДОЗИ

За целта на проучването бяха използвани мелатонин (Merck, Germany) и лузиндол (Sigma Chemicals, USA). Дневната доза мелатонин от 0.2 mg/kg b.w. и лузиндол – 0.4 mg/kg b.w. се прилагаха s.c. два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. Дозите на мелатонина и лузиндола определяхме въз основа на литературни данни и експериментално в предварителни проучвания.

## 3. СТРУКТУРИРАНЕ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИТЕ ГРУПИ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА ВЕЩЕСТВАТА

При всяко наблюдение експерименталната група животни се разделяше в четири подгрупи: *първа подгрупа* – инжектираше се с мелатонин (М); *втора подгрупа* – инжектираше се с лузиндол (Л); *трета подгрупа*

– инжектираше се с лужиндол (Л) и един час по-късно с мелатонин (М) и четвърта подгрупа – (контрола) – с физиологичен разтвор, разтворител на хормоните. Използваните вещества бяха във вид на субстанция и се разтваряха *ex tempore*. Приложението на хормоните се осъществяваше s.c., двукратно ежедневно, през 12 часа – между 7.30 и 8.00 часа и между 19.30 и 20.00 часа, в три последователни дни. Контролната група се третираше с физиологичен разтвор, по начин идентичен на хормона и неговия блокер. Продължителността на всяко наблюдение беше 72 часа.

#### **4. ПОЛУЧАВАНЕ НА ПЛАЗМА И СЪХРАНЯВАНЕ**

От плъхове под уретанова наркоза чрез кардиална пункция, осъществявана с еднократна спринцовка, се вземаше кръв (най-често 4.4 ml) с антикоагулант, в отношение 9:1. В болшинството от случаите като антикоагулант се използваше натриев цитрат 0.11 mmol/l. Специални антикоагулантни разтвори се използваха за определяне на следните показатели: тромбоцитен фактор 4 и бета-тромбоглобулин (СТАД епруветки, които съдържат мултикомпонентен антикоагулант: цитрат, теофилин, аденозин и дипиридамомл). Цитратната кръв се центрофугираше за 10 min при 3000 g, плазмата (супернатантът) се отделяше и съхраняваше при +4°C в хемостазни епруветки. Част от изследваните параметри (aPTT, PT, TT и брой тромбоцити) се определяха не по-късно от втория час след нейното отделяне, а за останалите показатели плазмата се замразяваше и определянето се извършваше в рамките на десет дни.

#### **5. ХИСТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ**

След вземане на кръв аутопсирахме животните и огледахме макроscopicки за кръвоизливи. От вътрешните органи (бъбрек, черен дроб, стомах, слезка) приготвихме препарати, оцветени с хематоксилин-еозин и

Weigert за фибрин и за установяване на микрокръвоизливи и вътресъдово съсирване.

## 6. ХЕМОСТАЗНИ ПОКАЗАТЕЛИ

В настоящия дисертационен труд са включени 11 показатели, представени по-долу по групи.

### 6.1. ИНТЕГРАЛНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ХЕМОСТАЗАТА

- **aPTT (Activated partial thromboplastin time)**, активирано парциално тромбoplastиново време, определяно по кинетичен коагулометричен метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **PT (Prothrombin time)**, протромбиново време, определяно по кинетичен коагулометричен метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **TT (Thrombin time)**, тромбиново време, определяно по кинетичен коагулометричен метод с кит на Diagnostica Stago, France.

### 6.2. ТРОМБОЦИТИ – БРОЙ И ФУНКЦИОНАЛНА АКТИВНОСТ

За определяне на тромбоцитния брой се използваше фазовоконтрастният метод на Feissly et Lüdin за камерно изброяване на тромбоцитите (Т. Лисичков, 1987).

Функционалната активност на тромбоцитите се определяше чрез плазмената концентрация на PF 4 (тромбоцитен фактор 4) и  $\beta$ -TG ( $\beta$ -тромбоглобулин), определяни чрез тестове на Diagnostica Stago, France.

### 6.3. ФАКТОР НА VON WILLEBRAND

- **vWF: Ag (von Willebrand factor, antigen)** фактор на фон Вилебранд, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **vWF: CB (Capacity of von Willebrand factor to bind to collagen)**, фактор на фон Вилебранд - капацитет за свързване на колаген, определян

по ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France.

#### 6.4. ТЪКАНЕН ФАКТОР

- **TF: Ag (Tissue factor, antigen)**, тъканен фактор, антиген, определян с ELISA метод и кит на American Diagnostica inc., USA

#### 6.5. ИНХИБИТОР НА ПЪТЯ НА ТЪКАНИЯ ФАКТОР

- **free TFPI: Ag (free Tissue-factor pathway inhibitor, antigen)** свободен инхибитор на пътя на тъканния фактор, антиген, определян с ELISA метод и кит на Diagnostica Stago, France
- **free TFPI: Act (free Tissue-factor pathway inhibitor, activity)** инхибитор на пътя на тъканния фактор, активност, определян с ELISA метод и кит на Diagnostica Stago, France

#### 6.6. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Статистическата обработка на резултатите беше извършена с помощта на софтуерен продукт GraphPad Prism 5, който позволяваше:

- изчисляване на относителен дял при определяне нивата на хемостазни показатели;
- изчисляване на средни стойности, статистическо разсейване и статистическа грешка за определяне на средни нива на хемостазни показатели;
- използване на t-тест на Стюдънт-Фишер за оценка на статистически хипотези за сравняване на резултатите от различни групи в статистически равномерен комплекс. Стойности на  $p < 0.05$  се считаха за статистически значими.

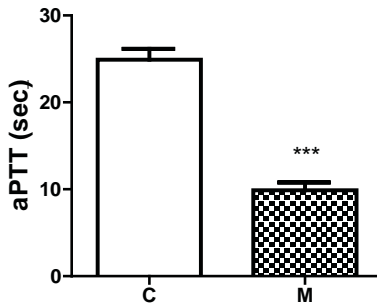
Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната ( $\bar{x} \pm S \bar{x}$ ).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. ДАННИ ОТ СКРИНИРАЩО ПРОУЧВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА МЕЛАТОНИНА И ЛУЗИНДОЛА ВЪРХУ ИНТЕГРАЛНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ХЕМОСТАЗАТА

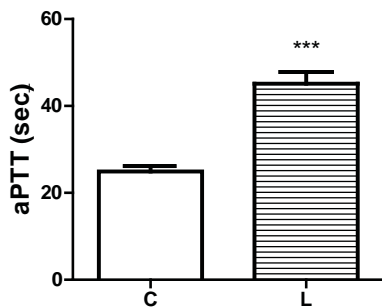
За целта бяха проучени както следва: активирано парциално тромбoplastиново време (аРТТ), протромбиново време (РТ) и тромбиново време (ТТ).

Резултатите са представени на фигури 1 - 9. От фигура 1 е видно, че мелатонинът скъсява аРТТ до  $9.88 \pm 0.91$  sec ( $p < 0.001$ ), при стойност на контролната група  $24.92 \pm 1.24$  sec.

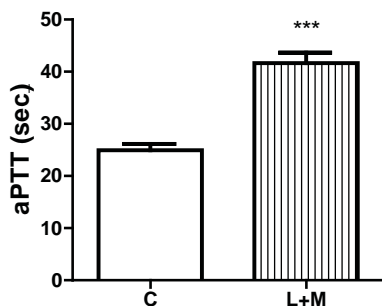


**Фиг. 1.** Ефект на М- мелатонин ( $0.2$  mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху аРТТ (активирано парциално тромбoplastиново време). С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

На фигура 2 се вижда, че лузиндолът удължава аРТТ до  $45.13 \pm 2.68$  sec ( $p < 0.001$ ), спрямо контролната група ( $24.92 \pm 1.24$  sec).



**Фиг. 2.** Ефект на L - лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху aPTT (активирано парциално тромбластиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

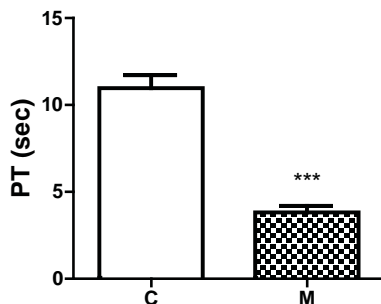


**Фиг. 3.** Ефекти на M - мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L - лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху aPTT (активирано парциално тромбластиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



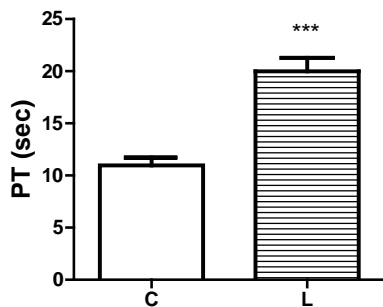
На фигура 3 е представен резултатът от претретирането с лизиндол, което удължава aPTT до  $41.65 \pm 1.97$  sec ( $p < 0.001$ ) при стойност на контролната група  $24.92 \pm 1.24$  sec.

Протромбиновото време, представено на фигура 4 е скъсено от мелатонина до  $3.82 \pm 0.36$  sec ( $p < 0.001$ ) спрямо PT на контролната група ( $10.97 \pm 0.74$  sec).

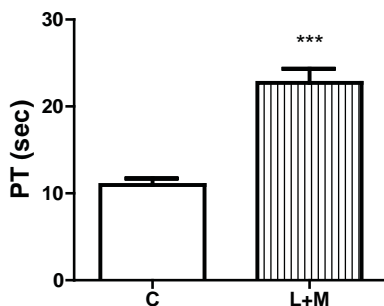


**Фиг. 4.** Ефект на М - мелатонин ( $0.2$  mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху PT (протромбиново време). С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

На фигура 5 се вижда, че лизиндолът удължава протромбиновото време до  $19.99 \pm 1.29$  sec ( $p < 0.001$ ), спрямо PT на контролната група ( $10.97 \pm 0.74$  sec).



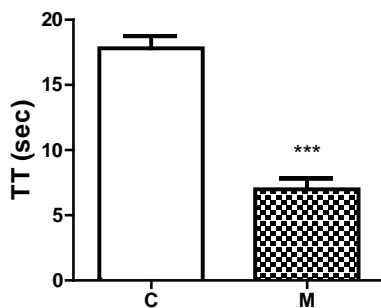
**Фиг. 5.** Ефект на L - лузидол (0.4 mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху PT (протромбиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 6.** Ефекти на M - мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L - лузидол (0.4 mg/kg b.w.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху PT (протромбиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

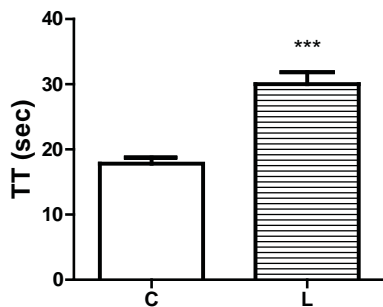
От фигура 6 е видно, че претретирането с лизиндол удължава протромбиновото време до  $22.72 \pm 1.62$  sec ( $p < 0.001$ ), при стойност на PT на контролната група  $10.97 \pm 0.74$  sec.

На фигура 7 се вижда, че мелатонинът скъсява TT до  $6.99 \pm 0.83$  sec ( $p < 0.001$ ), при средна стойност на контролната група  $17.82 \pm 0.92$  sec.

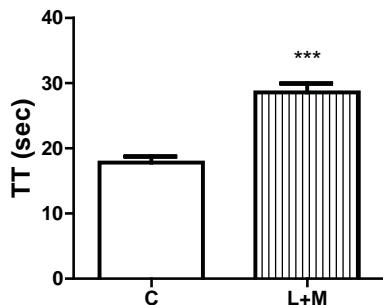


**Фиг. 7.** Ефект на М - мелатонин ( $0.2$  mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar, два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху TT (тромбиново време). С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Влиянието на лизиндола върху TT е представено на фигура 8. Вижда се, че лизиндолът удължава TT до  $30.01 \pm 1.83$  sec ( $p < 0.001$ ), при средна стойност на контролната група  $17.82 \pm 0.92$  sec.



**Фиг. 8.** Ефект на L - лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложен s.c. на мъжки плъхове Wistar; два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху TT (тромбиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 9.** Ефекти на M - мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L - лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar; два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни върху TT (тромбиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Претретирането с лужиндол (Фигура 9) удължава ТТ до  $28.59 \pm 1.36$  sec ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група ( $17.82 \pm 0.92$  sec).

Анализът на резултатите от това проучване показва, че мелатонинът предизвиква значими ( $p < 0.001$ ) и еднопосочни промени в трите интегрални показатели на хемокоагулацията: аРТТ, РТ и ТТ (Фигури 1,4 и 7). Тези промени убедително сочат, че епифизният хормон мелатонин, в приложените дози при плъхове води до скъсяване на техните времена, което е свидетелство за повлияване на хемостазата в посока на хиперкоагулабилитет. Тъй като аРТТ е показател, зависещ от факторите участващи във вътрешната система на образуване на протромбинов активатор, РТ – зависи от факторите участващи във външната система (път) на образуване на протромбинов активатор, а ТТ отразява превръщането на фибриногена във фибрин, може да се каже, че мелатонинът предизвиква тенденция към повишена съсирваемост на кръвта. Този ефект на хормона е резултат от скъсяване на времето, необходимо за образуване на протромбиновия активатор (протромбинов комплекс, който включва: плазмените фактори Va и Xa,  $Ca^{2+}$  и тромбоцитен фактор 3) по двете системи – вътрешна и външна, както и времето за трансформация на фибриногена във фибрин.

Самостоятелното приложение на лужиндол, неселективен инхибитор на  $MT_1$  и  $MT_2$  мелатониновите рецептори в нашето проучване удължава значимо ( $p < 0.001$ ) стойностите на аРТТ, РТ и ТТ (Фигури 2,5 и 8). Това най-вероятно се дължи на блокиране ефекта на ендогенния мелатонин. Комбинацията от лужиндол и мелатонин до голяма степен повтаря ефекта на самостоятелно приложения антагонист върху трите интегрални показатели на хемокоагулацията (Фигури 3,6 и 9). Този факт ни дава основание да предположим, че  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите медиират ефекта на екзогенния и ендогенния мелатонин.

Резултатите от изследването на интегрални показатели на хемостазата

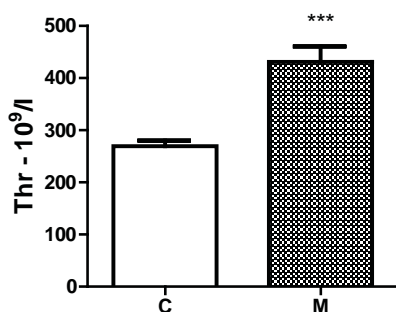
сочат повишена съсирваемост под влияние на хормона на епифизата. В същото време те поставят следните въпроси:

- Кои фактори, участващи в пусковия механизъм на хемостазата са повлияни?
- Какви са дискретните механизми на ефектите на мелатонина; дали са директни или опосредствани?
- В каква степен установените промени в хемостазата са свързани с ефекта на мелатонина върху ендотелните клетки, тромбоцити, хепатоцити?

## 2. ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИН И ЛУЗИНДОЛ ВЪРХУ БРОЯ, ФУНКЦИОНАЛНАТА АКТИВНОСТ НА ТРОМБОЦИТИТЕ И ПЛАЗМЕНИЯ ФАКТОР НА ФОН ВИЛЕБРАНД

Резултатите от ефектите на мелатонин и лузиндол върху броя и функционалната активност на тромбоцитите са представени на фигури 10 - 18.

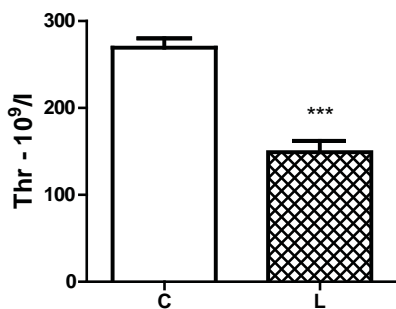
### 2.1. ЕФЕКТИ ВЪРХУ БРОЯ НА ТРОМБОЦИТИТЕ



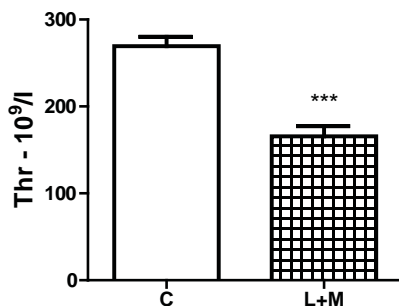
**Фиг. 10.** Промени в броя на тромбоцитите у мъжки плъхове Wistar под влияние на М – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.), приложен s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Резултатите, представени на фигура 10 показват, че при плъховете инжектирани с мелатонин, е налице повишаване на броя на тромбоцитите до  $431.10 \pm 29.49 \times 10^9/L$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група животни ( $269.30 \pm 10.86 \times 10^9/L$ ).

От фигура 11 се вижда, че лузиндолът понижава тромбоцитния брой до  $149.20 \pm 12.91 \times 10^9/L$  ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група ( $269.30 \pm 10.86 \times 10^9/L$ ).



**Фиг. 11.** Промени в броя на тромбоцитите у мъжки плъхове Wistar под влияние на L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложен s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

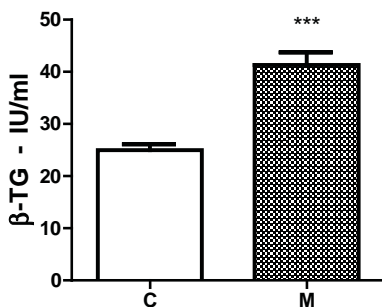


**Фиг. 12.** Промени в броя на тромбоцитите у мъжки плъхове Wistar под влияние на M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложени s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



Претретирането с лузиндол и последващото инжектиране на мелатонин 1 час по-късно (Фигура 12) води до понижаване на тромбоцитния брой до  $165.70 \pm 11.69 \times 10^9/L$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група животни –  $269.30 \pm 10.86 \times 10^9/L$ .

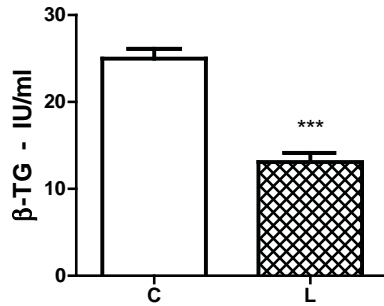
## 2.2. ЕФЕКТИ ВЪРХУ ФУНКЦИОНАЛНАТА АКТИВНОСТ НА ТРОМБОЦИТИТЕ



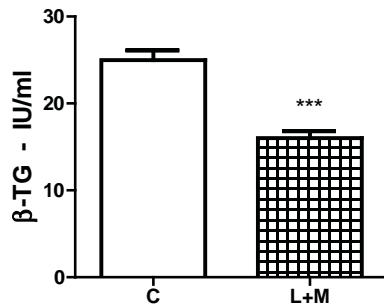
**Фиг. 13.** Плазмено ниво на  $\beta$ -TG ( $\beta$ -тромбоглобулин) у мъжки плъхове Wistar след третиране с М - мелатонин ( $0.2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), приложен s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

От фигура 13 се вижда, че при плъховете, третирани с мелатонин плазменото ниво на  $\beta$ -TG се повишава до  $41.31 \pm 2.41 \text{ IU/ml}$  ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група –  $24.98 \pm 1.12 \text{ IU/ml}$ .

На фигура 14 е показано, че лузиндолът понижава плазменото ниво на  $\beta$ -TG до  $13.09 \pm 1.03 \text{ IU/ml}$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група животни ( $24.98 \pm 1.12 \text{ IU/ml}$ ).

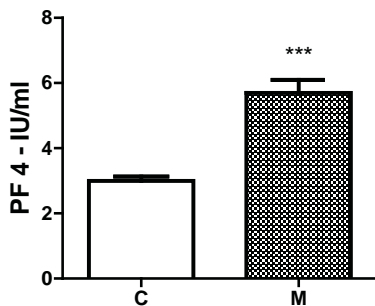


**Фиг. 14.** Плазмено ниво на  $\beta$ -TG ( $\beta$ -тромбоглобулин) у мъжки плъхове Wistar след третиране с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложен s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$  \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 15.** Плазмено ниво на  $\beta$ -TG ( $\beta$ -тромбоглобулин) у мъжки плъхове Wistar след третиране с M - мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), приложени s.c., два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

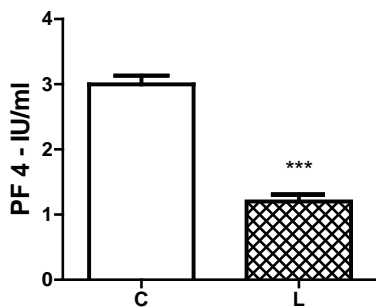
Резултатите от фигура 15 показват, че претретирането с лизиндол също понижава плазменото ниво на  $\beta$ -TG до  $16.02 \pm 0.79$  IU/ml ( $p < 0.001$ ) в сравнение със стойностите при контролната група –  $24.98 \pm 1.12$  IU/ml.



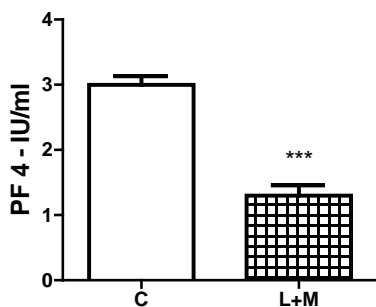
**Фиг. 16.** Стойности на PF 4 (тромбоцитен фактор 4) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с М – мелатонин ( $0.2$  mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

На фигура 16 се вижда, че плазменото ниво на PF 4 се повишава от мелатонина до  $5.70 \pm 0.39$  IU/ml ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група животни ( $3.00 \pm 0.13$  IU/ml).

Резултатите на фигура 17 показват, че плазменото ниво на PF 4 е понижено от лизиндола до  $1.20 \pm 0.10$  IU/ml ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група ( $3.00 \pm 0.13$  IU/ml).



**Фиг. 17.** Стойности на PF 4 (тромбоцитен фактор 4) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 18.** Стойности на PF 4 (тромбоцитен фактор 4) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Претретирането с лузиндол (Фигура 18) понижава плазменото ниво на PF 4 до  $1.30 \pm 0.15$  IU/ml ( $p < 0.001$ ), в сравнение с контролната група ( $3.00 \pm 0.13$  IU/ml).

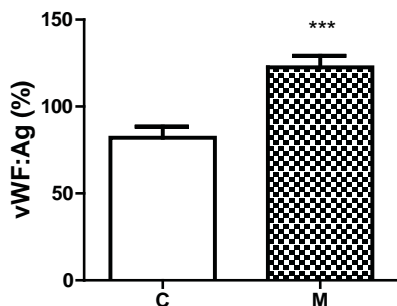
Тромбоцитите играят ключова роля във физиологичните и патологични процеси на хемостазата. Повишената им функционална активност е тригериращ сигнал за тромбообразуване, проблем от изключително значение за клиничната практика (S. Jain et al., 2010; H. Evsyukova, 2011, M. Ueno et al., 2011). Има данни, че тромбоцитите продуцират и складираат мелатонин (H. Evsyukova, 2011). Значимото увеличение на броя на тромбоцитите ( $p < 0.001$ ), представено на фигура 10, дава основание да се допусне, че епифизният хормон мелатонин най-вероятно стимулира тромбоцитите у плъхове. Съществуват данни, че мелатонинът стимулира образуването на тромбоцити вероятно чрез повишаване на мегакариоцитната фрагментация (P. Lissoni et al., 1999; L. Di Bella et al., 2006) и модулиране на цитокинната мрежа, участваща в тромбоцитната продукция (P. Lissoni et al., 1999). Лузиндолът, приложен самостоятелно в нашето проучване, намалява значимо ( $p < 0.001$ ) (Фигура 11) броя на тромбоцитите. Антагонистът на  $MT_1$  и  $MT_2$  мелатониновите рецептори вероятно блокира в значителна степен ефекта на ендогенния мелатонин. Претретирането с лузиндол (Фигура 12) сменя ефекта на мелатонина и почти изцяло повтаря ефекта на самостоятелно приложени антагонист върху тромбоцитния брой ( $p < 0.001$ ). В този смисъл ние предполагахме, че у плъхове  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите медиат ефекта на ендогенния и екзогенния мелатонин, като не може да се изключи влиянието и на други фактори. Най-вероятно става дума за комплексно действие на различни регулаторни механизми. Тези наши предположения кореспондират с данните на Dubocovich и сътр. (M. Dubocovich et al., 2010) според които у бозайници  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите вероятно медиат физиологичните ефекти на ендогенния и

екзогенния мелатонин.

Чрез определяне на плазменото ниво на  $\beta$ -TG и PF 4 се преценява функционалната активност на тромбоцитите. Това са специфични протеини, складирани в  $\alpha$ -гранулите и секретирани се при тяхната активация (D. Gurney et al., 2002; M. Rand et al., 2003; A. Kasperska-Zajac et al. 2008). Поради разликите в модела на освобождаване на  $\beta$ -TG и PF 4, се предлага използването едновременно на двата маркера (D. Gurney et al., 2002). Ние установяваме еднопосочност в ефекта на мелатонина върху броя на тромбоцитите и плазмените нива на  $\beta$ -TG и PF 4. Повишената концентрация на  $\beta$ -TG и PF 4 в плазмата на плъхове след третирането им с мелатонин ( $p < 0.001$ ) (Фигури 13 и 16) позволява да се заключи, че хормонът на епифизата значимо повишава активността на тромбоцитите. Има основание да се приеме също, че стимулираната тромбоцитна активност най-вероятно е един от механизмите, посредством които мелатонинът предизвиква показаната по-горе тенденция към хиперкоагулабилитет. Самостоятелно приложеният лузиндол в нашето изследване (Фигури 14 и 17) редуцира значимо ( $p < 0.001$ ) стойностите на  $\beta$ -TG и PF 4 в плазмата, а комбинацията лузиндол и мелатонин (Фигури 15 и 18) до голяма степен, особено за PF 4, повтаря ефекта на блокера. Това още веднъж потвърждава нашата теза, че потискането на  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите от техния антагонист най-вероятно инхибира ефекта на ендогенния и екзогенния мелатонин.

### 2.3. ЕФЕКТИ ВЪРХУ ПЛАЗМЕНОТО НИВО И АКТИВНОСТ НА ФАКТОРА НА ФОН ВИЛЕБРАНД

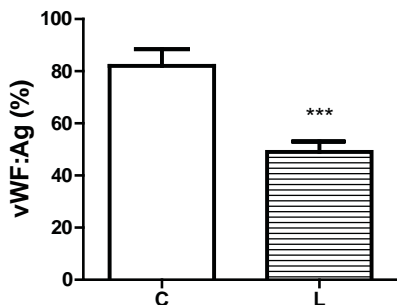
Резултатите са представени на фигури 19 – 24.



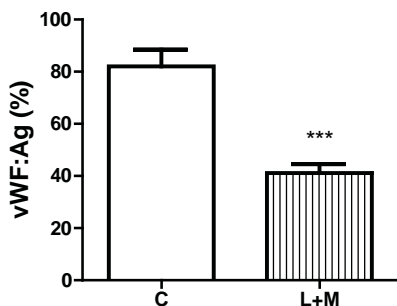
**Фиг. 19.** Стойности на vWF: Ag, (фактор на фон Вилебранд, антиген) в плазмата на мъжки плъхове Wistar; инжектирани s.c. с М – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Резултатите на фигура 19 показват, че под влияние на мелатонина плазмените нива на vWF антиген са силно повишени ( $122.50 \pm 6.63$ ) ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група плъхове ( $82.01 \pm 6.42$ ).

Третирането с лузиндол (Фигура 20) понижава нивата на vWF антиген до  $49.01 \pm 4.05$  ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група плъхове ( $82.01 \pm 6.42$ ).



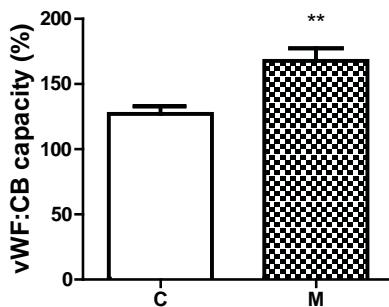
**Фиг. 20.** Стойности на vWF: Ag, (фактор на фон Вилебранд, антиген) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 21.** Стойности на vWF: Ag, (фактор на фон Вилебранд, антиген) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



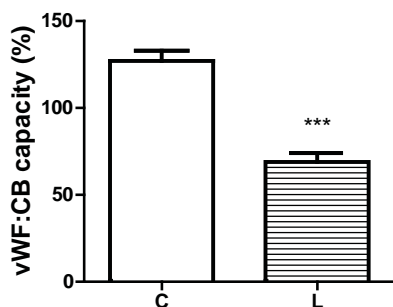
От фигура 21 става ясно, че претретирането с лузиндол също силно намалява плазмените нива на vWF антиген до  $41.10 \pm 3.41$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група ( $82.01 \pm 6.42$ ).



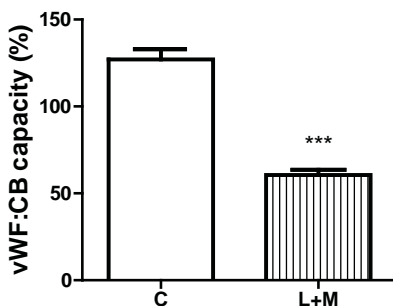
**Фиг. 22.** Стойности на vWF: CB капацитет (колаген-свързващ капацитет на фактора на фон Вилебранд), у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин ( $0.2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S \bar{x}$ ,  $** p < 0.01$ .

На фигура 22 се вижда, че активността на vWF нараства под влияние на мелатонин до  $167.70 \pm 9.65$  ( $p < 0.01$ ) в сравнение с контролната група плъхове ( $127.10 \pm 5.79$ ).

Фигура 23 показва, че лузиндолът намалява активността на vWF до  $68.91 \pm 5.15$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група ( $127.10 \pm 5.79$ ).



**Фиг. 23.** Стойности на vWF:CB капацитет (колаген-свързващ капацитет на фактора на фон Вилебранд), у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



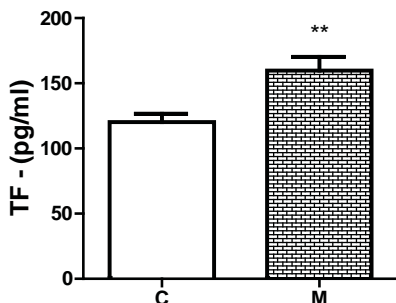
**Фиг. 24.** Стойности на vWF:CB капацитет (колаген-свързващ капацитет на фактора на фон Вилебранд), у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

От фигура 24 става ясно, че претретирането с лузиндол отново намалява активността на vWF до  $60.54 \pm 3.04$  ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група ( $127.10 \pm 5.79$ ).

Известно е, че факторът на vWF има тригерираща роля за нормалната хемостаза, а от друга страна нарастването на неговото ниво в плазмата следва да се разглежда като рисков тромбогенен фактор (U. Vischer, 2006; A. Reiningger, 2008). Ето защо установеното в случая значимо повишено антигенно ниво на vWF (Фигура 19) ( $p < 0.001$ ) и на неговата активност (Фигура 22) ( $p < 0.01$ ) под влияние на епифизния хормон приемаме като факт, който позволява да се каже, че мелатонинът предизвиква у плъхове тенденция към хиперкоагулабилитет. Не по-малко важна информация дават резултатите, получени от групата плъхове инжектирани с лузиндол. В случая, блокирането на мелатониновите рецептори ( $MT_1$  и  $MT_2$ ) предизвиква силно понижение както на антигенното ниво на vWF (Фигура 20) ( $p < 0.001$ ), така и на активността на vWF (Фигура 23) ( $p < 0.001$ ). Считаме, че значимо понижените стойности са резултат преди всичко от невъзможността ендогенният мелатонин да осъществи своите стимулиращи ефекти върху образуването на vWF и неговото активиране. Приложението на лузиндол, последвано от мелатонин по своята същност не се различава от току-що разгледаните резултати, тоест от самостоятелното приложение на блокера. Наложително е да се добави, че в случая блокирането на мелатониновите рецептори блокира ефектите както на ендогенния мелатонин, така и на екзогенния, което може да обясни значимо по-ниските стойности на vWF: Ag (Фигура 21) ( $p < 0.001$ ) и vWF: Act (Фигура 24) ( $p < 0.001$ ) от тези на контролната група. Видно е, че мелатонинът е важен регулатор на цялата верига, от биосинтезата на vWF – до формиране на vWF с висока активност.

### 3. ВЛИЯНИЕ НА МЕЛАТОНИН И ЛУЗИНДОЛ ВЪРХУ ТЪКАНИЯ ФАКТОР, ПЛАЗМЕНОТО НИВО И АКТИВНОСТ НА ИНХИБИТОРА НА ПЪТЯ НА ТЪКАНИЯ ФАКТОР

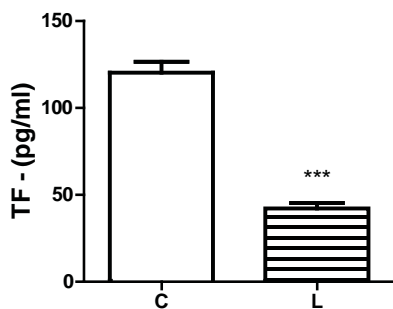
Ефектите на мелатонин и лузиндол върху тъканния фактор и инхибитора на пътя на тъканния фактор са представени на фигури 25 – 33.



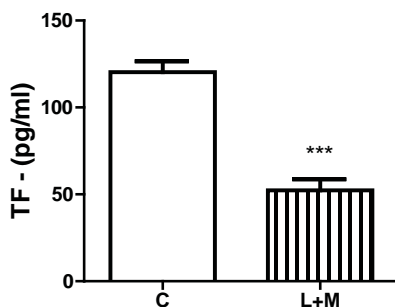
**Фиг. 25.** Стойности на TF (тъканен фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с М – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\* -  $p < 0.01$ .

От фигура 25 е видно, че мелатонинът повишава плазмените нива на TF от  $120.30 \pm 6.29$  при контролите на  $159.80 \pm 10.42$  ( $p < 0.01$ ).

Самостоятелното приложение на лузиндол (Фигура 26) понижава стойностите на TF на  $42.23 \pm 3.05$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група ( $120.30 \pm 6.29$ ).



**Фиг. 26.** Стойности на TF (тъканен фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



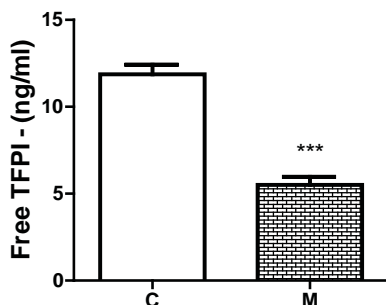
**Фиг. 27.** Стойности на TF (тъканен фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

На фигура 27 е представено претретирането с лузиндол, с последващо инжектиране на мелатонин, което понижава стойностите на TF на  $52.31 \pm 6.34$  ( $p < 0.001$ ) в сравнение с контролната група  $120.30 \pm 6.29$ .

Беше показано на фигура 25, че мелатонинът, приложен на плъхове, предизвиква сигнификантно повишение на плазмените нива на TF ( $p < 0.01$ ), в сравнение с контролната група. Доколкото TF е познат преди всичко като тригер на външния път на хемокоагулация и на тромбогенезата при редица заболявания (N. Mackman, 2004; N. Mackman, 2006; R. Kasthuri et al., 2010), би могло да се приеме, че мелатонинът предизвиква тенденция към хиперкоагулабилитет. Това предположение се подкрепя от получените от нас данни за влиянието на епифизния хормон върху интегрални показатели на хемостазата. Те убедително сочат, че този хормон нарушава равновесието между коагулантна и антикоагулантна система, в полза на коагулантната. Изложеното дотук позволява да се приеме, че повишеното плазмено ниво на TF под влияние на мелатонин, е част от механизма, обясняващ тенденцията към хиперкоагулабилитет. Самостоятелното приложение на лузиндол редуцира силно нивото на TF (Фигура 26) ( $p < 0.001$ ), което дава основание да се приеме като най-вероятно, че блокирането на мелатониновите рецептори ( $MT_1$  и  $MT_2$ ) сменя до голяма степен ефекта на ендогенния мелатонин върху структурите, свързани с образуването на този фактор. Не е изключено също, макар и хипотетично, лузиндолът да инхибира в някаква степен биосинтезата и секрецията на ендогенен мелатонин, което да има отношение към крайния ефект. Към момента липсват литературни данни за нивото на мелатонина в плазмата след приложение на лузиндол. Особен интерес представляват резултатите, свързани с групата животни, където мелатонинът е приложен след претретиране с лузиндол (Фигура 27) ( $p < 0.001$ ). От една страна, резултатът повтаря този от самостоятелното приложение на лузиндола. От друга страна, той показва, че блокирането на мелатониновите рецептори потиска ефекта на ендогенния

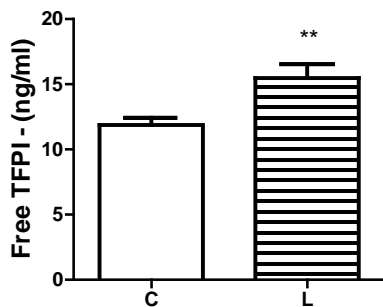
и екзогенния мелатонин, т.е. тази постановка е ново доказателство както за ролята на мелатониновите рецептори, така и за значението на ендогенния мелатонин за образуването на TF.

На фигура 28 се вижда, че мелатонинът силно понижава стойностите на свободния TFPI до  $5.50 \pm 0.46$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група плъхове ( $11.87 \pm 0.54$ ).

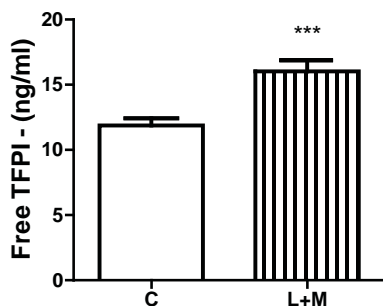


**Фиг. 28.** Стойности на свободния TFPI (инхибитор на пътя на тъканния фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с М – мелатонин ( $0.2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Фигура 29 отразява повишаването на нивото на свободния TFPI от лузиндола до  $15.48 \pm 1.06$  ( $p < 0.01$ ) в сравнение с контролната група ( $11.87 \pm 0.54$ ).



**Фиг. 29.** Стойности на свободния TFPI (инхибитор на пътя на тъканния фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*  $p < 0.01$ .

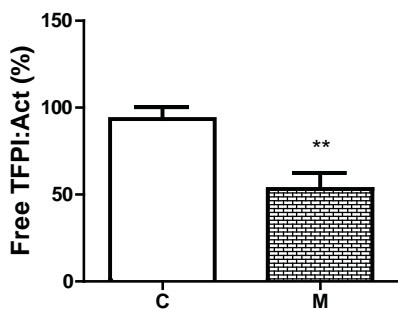


**Фиг. 30.** Стойности на свободния TFPI (инхибитор на пътя на тъканния фактор) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузиндол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



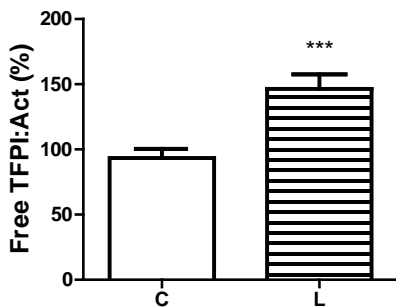
На фигура 30 е представен ефекта на претретирането с лузиндол върху нивата на свободния TFPI. Инхибиторът на  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите повишава TFPI на  $16.03 \pm 0.85$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролите ( $11.87 \pm 0.54$ ).

На фигура 31 се вижда, че мелатонинът понижава активността на свободния TFPI от  $93.41 \pm 6.96$  при контролите - на  $53.19 \pm 9.29$  ( $p < 0.01$ ).

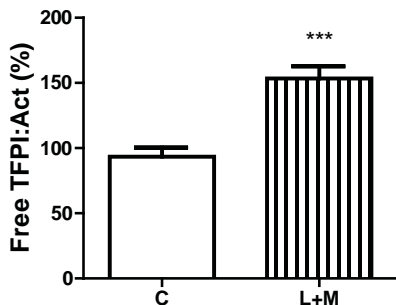


**Фиг. 31.** Стойности на свободния TFPI: Act (активност на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор) у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин ( $0.2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ,  $** p < 0.01$ .

Фигура 32 показва, че лузиндолът повишава активността на свободния TFPI на  $146.50 \pm 11.05$  ( $p < 0.001$ ) спрямо контролната група ( $93.41 \pm 6.96$ ).



**Фиг. 32.** Стойности на свободния TFPI: Act (активност на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор) у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с L – лузидол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 33.** Стойности на свободния TFPI: Act (активност на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор) у мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с M – мелатонин (0.2 mg/kg b.w.) и L – лузидол (0.4 mg/kg b.w.), два пъти дневно, през 12 часа, в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

На фигура 33 е отразено повишаването на активността на свободния TFPI на  $153.40 \pm 9.31$  ( $p < 0.001$ ) в резултат на претретирането с лузиндол, в сравнение с контролната група ( $93.41 \pm 6.96$ ).

Инхибиторът на пътя на тъканния фактор (TFPI) е известен като основен физиологичен инхибитор на TF – медираната коагулационна каскада (R. Kasthuri et al., 2010; P. Ellery, M. Adams, 2014; J. Wood et al., 2014). Изхождайки от този факт и от добре познатия механизъм на действие на TFPI (T. Girard et al., 1989; L. Petersen et al., 1996; R. Vaughn et al., 1998; J. Crawley, D. Lane, 2008) има основание да се приеме, че значимо по-ниските нива на свободния TFPI (Фигура 28) ( $p < 0.001$ ) и особено на активността на свободния TFPI (Фигура 31) ( $p < 0.01$ ) под влияние на мелатонина, неизбежно се съпътстват от развитие на тенденция към хиперкоагулация.

Лузиндолът, приложен самостоятелно повишава значимо както свободния TFPI (Фигура 29) ( $p < 0.01$ ), така и неговата активност (Фигура 32) ( $p < 0.001$ ). Този факт показва, че мелатониновите рецептори ( $MT_1$  и  $MT_2$ ) имат многопосочни ефекти. От една страна, те медираат ефектите на мелатонина, а от друга – тяхното блокиране активира образуването както на свободната форма на TFPI, така и на свободен TFPI с висока активност. Нашето проучване не позволява да се каже дали блокирането на тези рецептори иницира повишена биосинтеза на TFPI или иницира промени само в изследваните показатели – свободен TFPI и активност на свободния TFPI.

Претретирането с лузиндол (Фигури 30 и 33) почти изцяло повтаря резултатите от самостоятелното приложение на блокера и е ново доказателство, че е блокиран ефекта на екзогенния и ендогенния мелатонин, а също така за значението на неговите рецептори за плазменото ниво на свободния TFPI и неговата активност.

#### 4. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

Получените и представени до тук резултати биха могли да бъдат обобщени с цел да се придобие по-пълна представа за ролята на епифизния хормон мелатонин за хемостазата у плъхове. За целта на проучването са използвани мъжки плъхове Wistar, които бяха третирани с мелатонин в ниски фармакологични дози, лузиндол (неселективен инхибитор на  $MT_1$  и  $MT_2$  рецептори), както и претретирани с лузиндол и приложен един час по-късно мелатонин.

Особено голямо значение за цялостния ход на проучването имаха резултатите, произтичащи от ефектите на мелатонин, лузиндол и комбинацията от лузиндол и мелатонин върху следните интегрални показатели на хемостазата – аРТТ, РТ и ТТ. Беше установено (Фигури 1,4 и 7), че аРТТ, РТ и ТТ са силно скъсени ( $p < 0.001$ ) под влияние на мелатонина, което убедително доказва, че пинеалният хормон променя хемостазата в посока на хиперкоагулабилитет.

Скъсеното аРТТ говори за нарушено образуване на протромбиновия комплекс по вътрешната система (A. Mina et al., 2010), скъсеното РТ – за нарушено образуване по външната система (S. Vajaj, J. Joist, 1999), а ТТ отразява скъсеното време за трансформация на фибриногена във фибрин.

Самостоятелното приложение на лузиндол (Фигури 2,5 и 8), удължава значимо ( $p < 0.001$ ) стойностите на аРТТ, РТ и ТТ, което говори за тенденция към хипокоагулабилитет. Това най-вероятно се дължи на блокиране на ефекта на ендогенния мелатонин върху коагулацията. Комбинацията от лузиндол и мелатонин (Фигури 3,6 и 9) до голяма степен повтаря ефекта от самостоятелно приложения антагонист върху трите показателя – аРТТ, РТ и ТТ, т.е отново налице са данни за тенденция към хипокоагулабилитет. Трябва обаче да добавим, че в случая лузиндолът най-вероятно сменя ефектите както на екзогенния, така и на ендогенния мелатонин. Считаме, че това е поредно доказателство в полза на рецепторно медираните ефекти на мела-

тонина върху наблюдаваните промени.

Получените промени в трите интегрални показатели, говорещи за повишена съсирваемост, позволяват да се формулират следните основни въпроси:

- Кои фактори на пусковия механизъм на хемостазата се повлияват?
- Как се осъществяват ефектите на мелатонина – директно или индиректно, т.е. има ли епифизният хормон автономни ефекти върху хемостазата?
- Какво повлиява мелатонинът: биосинтезата или активирането на съответните фактори на хемостазата?

Тези въпроси послужиха като отправна точка за формулиране на следващите задачи от нашето проучване.

Изхождайки от факта, че тромбоцитите заемат централно място в хемостазата (R. S. Kasthuri et al., 2010; A. Viera-de-Abreu et al., 2012), непосредствената ни задача беше да проучим влиянието на мелатонина и лузиндола върху броя и функционалната активност на тромбоцитите.

Установи се, че под влияние на мелатонина значимо ( $p < 0.001$ ) е увеличен броят на тромбоцитите (Фигура 10). Тъй като съществуват данни, че мелатонинът стимулира образуването на тромбоцити от мегакариоцитите (M. Lissoni et al., 1999; L. Di Bella et al., 2006), приемаме, че пинеалният хормон има стимулиращ ефект върху тромбоцитите. Проучването на ефекта на мелатонина върху функционалната активност на тромбоцитите чрез определяне на плазмените нива на  $\beta$ -TG и PF 4 показва, че техните нива са силно увеличени (Фигури 13 и 16) ( $p < 0.001$ ). Тъй като  $\beta$ -TG и PF 4 са специфични протеини на тромбоцитите, складирани в  $\alpha$ -гранулите и секретирани се при тяхната активация (M. Rand et al., 2003; A. Kasperska-Zajac et al. 2008), считаме, че мелатонинът повишава функционалната активност на тромбоцитите. Това безспорно е свързано с установената от нас повишена съсирваемост под влияние на епифизния хормон.

Приложеният самостоятелно лузиндол намалява значимо както броя на тромбоцитите (Фигура 11) ( $p < 0.001$ ), така и функционалната им активност (Фигури 14 и 17) ( $p < 0.001$ ), изследвана чрез плазмените нива на  $\beta$ -TG и PF 4. Антагонистът на  $MT_1$  и  $MT_2$  мелатониновите рецептори вероятно блокира в значителна степен ефекта на ендогенния хормон. Претретирането с лузиндол и последващото приложение на мелатонин повтарят ефекта на самостоятелно приложения инхибитор върху броя (Фигура 12) ( $p < 0.001$ ) и функционалната активност (Фигури 15 и 18) ( $p < 0.001$ ) на тромбоцитите. В този смисъл ние предполагахме, че у плъхове  $MT_1$  и  $MT_2$  рецепторите медираат ефекта на ендогенния и екзогенния мелатонин. Не може да се изключи обаче и влиянието на други фактори, както и извънрецепторно повлияване на изследваните показатели от мелатонина и лузиндола.

От изключително значение за хемостазата е ролята на vWF (A. Reininger, 2008; T. Szanto et al., 2012). Под влияние на мелатонина в нашето проучване значимо и еднопосочно са повишени неговата антигенна концентрация (Фигура 19) ( $p < 0.001$ ) и активност (Фигура 22) ( $p < 0.01$ ), определена чрез колаген - свързващ капацитет. Считаме, че този факт най-вероятно има определящо значение за стимулираната функционална активност на тромбоцитите (Фигури 13 и 16).

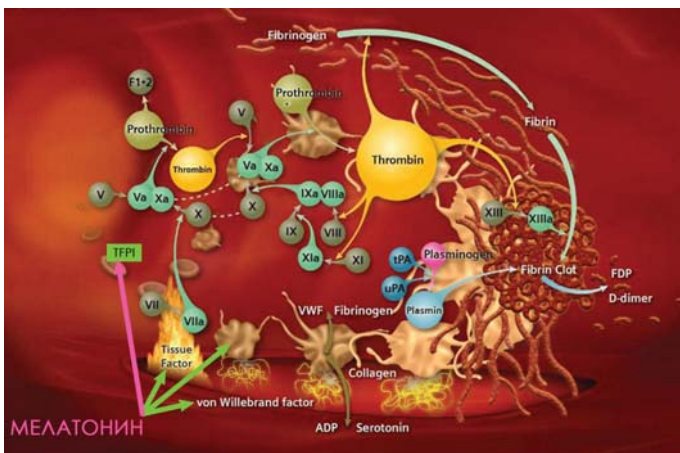
Самостоятелното приложение на лузиндол понижава силно както антигенното ниво на vWF (Фигура 20) ( $p < 0.001$ ), така и неговата активност (Фигура 23) ( $p < 0.001$ ). Приемаме това за доказателство, че е блокиран ефекта на ендогенния мелатонин, който не може да осъществи стимулиращия си ефект върху образуването и активирането на vWF. Приложението на лузиндол и един час по-късно на мелатонин в голяма степен повтаря ефекта на антагониста. Понижени са значимо двата показателя - антигенното ниво на vWF (Фигура 21) ( $p < 0.001$ ) и неговата активност (Фигура 24) ( $p < 0.001$ ). В този случай обаче блокирането на мелатониновите рецеп-

тори сменя ефекта както на ендогенния, така и на екзогенния мелатонин. Приемаме тези факти като доказателство, че епифизният хормон регулира процесите от биосинтезата на vWF до неговото активиране.

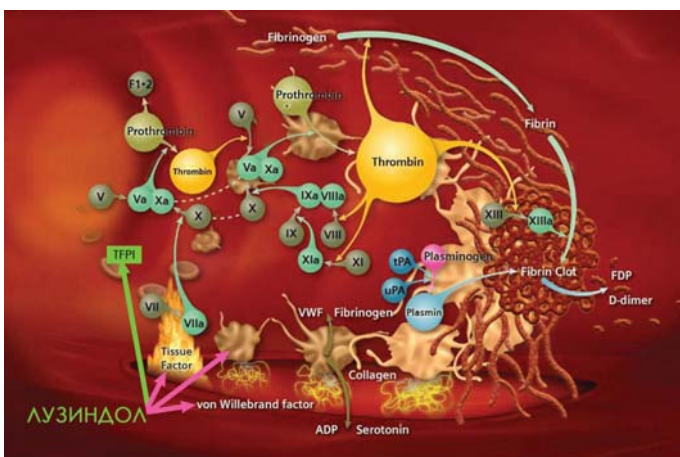
Специално внимание в нашите изследвания беше отделено на ефектите на мелатонина и лузиндола върху TF и TFPI. Установеното повишено плазмено ниво на TF (Фигура 25) ( $p < 0.01$ ), значимо по-ниските нива на свободния TFPI (Фигура 28) ( $p < 0.001$ ) и особено на неговата активност (Фигура 31) ( $p < 0.01$ ) под влияние на мелатонина се приема като важно доказателство за стимулирано образуване на протромбиновия комплекс по външната система.

Самостоятелното приложение на лузиндол (Фигура 26) понижава силно ( $p < 0.001$ ) нивото на TF, повишава значимо свободния TFPI (Фигура 29) ( $p < 0.01$ ) и в още по-голяма степен неговата активност (Фигура 32) ( $p < 0.001$ ). Това позволява да направим извода, че най-вероятно блокирането на мелатониновите рецептори ( $MT_1$  и  $MT_2$ ) сменя ефекта на ендогенния мелатонин. Приложеният след претретиране с лузиндол мелатонин води до същия резултат - понижава нивото на TF (Фигура 27) ( $p < 0.001$ ) и повишава свободния TFPI (Фигура 30) ( $p < 0.001$ ) и неговата активност (Фигура 33) ( $p < 0.001$ ). Този факт приемаме като ново доказателство, че е блокиран ефекта на ендогенния и екзогенния мелатонин. Въпреки, че нашето проучване не ни позволява да кажем дали блокирането на мелатониновите рецептори иницира повишена синтеза на TFPI, или само промени в свободния TFPI и неговата активност, то още веднъж потвърждава значението на рецепторите на пинеалния хормон за нивото на свободния TFPI и неговата активност в плазмата.

Казаното до тук за ефектите на мелатонина и лузиндола върху факторите на пусковия механизъм на хемостазата е добре илюстрирано на фигури 34, 35 и 36.



**Фиг. 34.** Ефекти на мелатонин върху активността на факторите на пусковия механизъм на хемостазата. Червена стрелка – инхибиране, зелени стрелки – активиране.



**Фиг. 35.** Ефекти на лузиндол върху активността на факторите на пусковия механизъм на хемостазата. Червени стрелки – инхибиране, зелена стрелка – активиране.





**Фиг. 36.** Ефекти на претретирането с лузиндол върху активността на факторите на пусковия механизъм на хемостазата. Червени стрелки – инхибиране, зелена стрелка – активиране.

Като цяло резултатите от нашето проучване говорят за активиране на факторите, формиращи пусковия механизъм на хемостазата под влияние на мелатонин. Това до голяма степен обяснява тенденцията към хиперкоагулабилитет, установена чрез промените в aPTT и PT. Самостоятелното приложение на лузиндол сменя ефекта на ендогенния мелатонин, а претретирането с лузиндол – тези на ендогенния и екзогенния мелатонин. Решаващо значение за наблюдаваните ефекти на мелатонина имат мембранните  $MT_1$  и  $MT_2$  рецептори.

## ИЗВОДИ

1. Триденвното третиране на мъжки плъхове Wistar с мелатонин предизвиква значимо скъсяване на aPTT, PT и TT, което е израз на тенденция към хиперкоагулабилитет. Лузиндолът (неселективен инхибитор на MT<sub>1</sub> и MT<sub>2</sub> мелатонинови рецептори), приложен самостоятелно и в комбинация с мелатонин, силно удължава aPTT, PT и TT и поражда противоположен ефект върху хемокоагулацията (хипокоагулабилитет).
2. Мелатонинът увеличава плазмената концентрация на  $\beta$  - тромбоглобулин и тромбоцитен фактор 4, което е доказателство за стимулирана реакция на секреция на тромбоцитите. Самостоятелно приложеният лузиндол и претретирането с лузиндол редуцира значимо нивата на тези показатели, т.е. лузиндолът потиска процесите лимитиращи секреторната активност на тромбоцитите.
3. Мелатонинът значимо увеличава броя на тромбоцитите, плазменото ниво на vWF: Ag и активността на vWF, което е важно свидетелство за активиране на пусковия механизъм на хемокоагулацията по вътрешната система, а лузиндолът (приложен самостоятелно или в комбинация с мелатонин) потиска този механизъм.
4. Мелатонинът повишава плазмената концентрация на TF и същевременно понижава плазмените нива на свободния TFPI: Ag и активност на свободния TFPI, което има инициращо значение за включване на външния път за образуване на протромбинов активатор. Лузиндолът, приложен както самостоятелно, така и в комбинация с мелатонин, има инхибиращ ефект върху пусковия механизъм на коагулационната каскада по външния път, видно от специфичните промени в изследваните показатели – намалено плазмено ниво на TF, повишено ниво и активност на свободния TFPI.

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. Настоящият дисертационен труд е първо по рода си проучване на ефектите на мелатонина и на инхибитора на неговите рецептори ( $MT_1$  и  $MT_2$ ) лузиндол върху факторите имащи пусково значение за хемостазата, проведено в условия максимално близки до физиологичните. Научните приноси са формулирани на основата на експериментални доказателства и са публикувани за първи път.
2. Установено е, че мелатонинът е значим регулатор на пусковия механизъм на хемостазата, като го активира, който чрез extrinsic и intrinsic системата води до тенденция към хиперкоагулабилитет, докато лузиндолът инхибира тези процеси и предизвиква обратна тенденция – към хипокоагулабилитет.
3. Показано е, че епифизният хормон мелатонин потиска активността на TFPI – един от трите антикоагулантни пътя, а инхибиторът на неговите ефекти – лузиндол, я повишава. Тези промени в активността на TFPI представляват важно допълнение за механизма, посредством който мелатонинът предизвиква повишена съсирваемост на кръвта, а лузиндолът значимо я намалява.
4. Установено е, че лузиндолът, инжектиран 1 час преди третиране с мелатонин, предизвиква у плъховете промени в изследваните показатели, които са еднопосочни с наблюдаваните след неговото самостоятелно приложение. Доказва се, че ефектите на мелатонина – екзогенен и ендогенен, се медиират от  $MT_1$  и  $MT_2$  рецептори.

5. Значимото активиране на пусковия механизъм на хемостазата под влияние на мелатонин, с последващо развитие на тенденция към хиперкоагулабилитет, дава основание, от една страна, да се проучи ефекта на този хормон върху фибринолизата и от друга – макар и спекулативно, да се допусне необходимостта от превантивен хемостазен контрол при пациенти приемащи мелатонин под различни форми.

## ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### ПЪЛНОТЕКСТОВИ ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Pashalieva I.**, E. Stancheva, L. Decheva, Y. Nyagolov, N. Negrev. Experimental date about melatonin effects on platelet count and functional activity. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences 2012; 65(6):855-860. **(IF - 0.219)**
2. **Pashalieva I.**, L. Decheva, E. Stancheva, Y. Nyagolov, N. Negrev. Melatonin and luzindole - induced effects on integral blood coagulation parameters in rats. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences 2014; 67(9):1269-1274. **(IF - 0.219)**
3. Negrev N., Y. Nyagolov, A. Zarkova, **I. Pashalieva**, E. Stancheva, D. Radkova. Effects of melatonin and luzindole on plasma levels of tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and von Willebrand factor in rats. Scripta Scientifica Medica 2015; 47(1):64-69.

### ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

4. **Pashalieva I.**, L. Decheva, E. Stancheva, Y. Nyagolov, N. Negrev. Screening study of melatonin effects on basic integral parameters of blood coagulation (PT, aPTT, TT, ECLT). FEPS physiology congress, **Istanbul, Turkey**, September 3-7, 2011. Acta Physiologica 2011, vol. 203, Suppl. 686:177.
5. **Pashalieva I.**, E. Stancheva, L. Decheva, Y. Nyagolov, N. Negrev. Experimental date about the effect of melatonin on the count and functional activity of thrombocytes. X National congress of Bulgarian society for physiological sciences, **Varna**, 6-9 october, 2011. Scripta Scientifica Medica 2011; 43(3):229.