

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ.Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“  
ВАРНА**

**Факултет медицина**

**Катедра по физиология и патофизиология**

**УНС по физиология**

**Д-р Антония Пламенова Хачмериян**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДОКАЗАТЕЛСТВА ЗА ХИПОКОАГУЛАБИЛИТЕТ,  
ПОРОДЕН ОТ ТИМУСНИТЕ ПЕПТИДИ ТИМУЛИН, ТИМОЗИН-АЛФА 1 И  
ТИМОЗИН-БЕТА 4**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен ръководител**

Проф.д-р Негрин Негрев, д.м.н.

**Варна, 2017**

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ.Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“  
ВАРНА**

**Факултет медицина**

**Катедра по физиология и патофизиология**

**УНС по физиология**

**Д-р Антония Пламенова Хачмериян**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДОКАЗАТЕЛСТВА ЗА ХИПОКОАГУЛАБИЛИТЕТ,  
ПОРОДЕН ОТ ТИМУСНИТЕ ПЕПТИДИ ТИМУЛИН, ТИМОЗИН-АЛФА 1 И  
ТИМОЗИН-БЕТА 4**

**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:**

Проф. д-р Александър Стойнев, д.м.н.

Проф. д-р Димитър Терзииванов, д.м.н.

**Варна, 2017**

Дисертационният труд съдържа 148 стандартни страници, онагледен е с 19 фигури и 1 таблица. Библиографията включва 466 литературни източника, от които 2 на кирилица, а останалите- на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедрен съвет на катедрата по физиология и патофизиология, Медицински университет- Варна.

Номерацията на фигурите в автореферата не отговаря на номерацията в дисертационния труд.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... ч. в.....  
на открито заседание на научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на Медицински университет- Варна.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Често използвани съкращения.....	6
Въведение.....	7
Цел и задачи на проучването.....	10
Цел.....	10
Задачи.....	10
Материали и методи.....	11
1. Експериментални животни и условия.....	11
2. Използвани вещества и дози.....	11
3. Експериментални групи- структуриране и приложение на тимусните пептиди.....	12
4. Получаване на плазма и съхраняване.....	12
5. Хистологично изследване.....	13
6. Хемостазни показатели.....	13
6.1. Интегрални показатели на хемостазата.....	14
6.2. Ранни маркери на хемокоагулацията.....	14
6.3. Интринзик система- основни плазмени фактори, определяни като активност (Act).....	14
6.4. Фактори на пусковия механизъм на екстринзик системата.....	15
7. Статистически анализ на резултатите.....	15
Резултати и обсъждане.....	16
1. Данни от скриниращо проучване на влиянието на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху интегралните показатели на хемостазата.....	16
2. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху фибринопептид А и протромбинов фрагмент 1+2.....	19
3. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху основните плазмени фактори на хемокоагулация по вътрешната система.....	22

4. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху пусковия механизъм на коагулационната каскада по външната система.....	28
5. Заключително обсъждане.....	35
Изводи.....	44
Научни приноси.....	45
Публикации, свързани с дисертационния труд.....	46

## ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**T $\alpha$ 1**- тимозин-алфа 1

**T $\beta$ 4**- тимозин-бета 4

**TF5**- тимозин-фракция 5

**TF**- тъканен фактор

**TFPI**- инхибитор на пътя на тъканния фактор

**FVII**- плазмен фактор на съсирването VII

**FIX**- плазмен фактор на съсирването IX

**FX**- плазмен фактор на съсирването X

**FXI**- плазмен фактор на съсирването XI

**FXII**- плазмен фактор на съсирването XII

**ФП А**- фибринопептид А

**aPTT**- активирано парциално тромбoplastиново време

**PT**- протромбиново време

**PF 1+2**- протромбинов фрагмент 1+2

## ВЪВЕДЕНИЕ

Тимусът е описан за пръв път от Гален (130-200 г. н.е.) и остава енигматичен орган без ясни функции в продължение на векове. Причисляването му към ендокринните жлези, става в самото начало на XX век, когато шведският изследовател J. August Hammar докладва, че тимусът участва в невроендокринни регулаторни процеси, описвайки връзката между тимусната хиперплазия и акромегалията, хипертироидизма и гонадектомията (Hammar, 1921). Идентифицирани са редица тимусни „хормони“, но голяма част от взаимоотношенията между тимусните епителни клетки, тимоцитите и останалите невроендокринни структури, не се вписват в класическия ендокринен модел и остават неясни.

През 1961 г., след като Jacques F.A.P. Miller демонстрира жизненоважната роля на тимуса при Т-клетъчното развитие и диференциация (Miller, 1961), към ендокринните функции се добавят и имунни- тимусът е определен като водещия имуногенен орган на организма.

Тимусните епителни клетки произвеждат семейство хормоно-подобни пептиди, които имат способността да модулират редица имунни и неимунни отговори на организма. Някои от тези хуморални фактори са основно имуновъзстановяващи агенти, други играят роля на актин-секвестриращи вещества или стимулират невроендокринни секреции. Физиологичните процеси, които тимусните пептиди повлияват, включват стимулиране или потискане на имунните реакции, регулиране на ангиогенезата и участие в заздравяването на рани. Тимусните пептиди притежават широк терапевтичен потенциал и в клиничната практика се използват при тимус-зависими имунодефицитни състояния, възпалителни заболявания, злокачествени заболявания, като невропротектори, антиоксиданти, като агенти, подпомагащи ангиогенезата и ендотелната клетъчна миграция.

През последните 20 години, се наблюдава засилен интерес към проучване на имунните и хормонални ефекти на тимуса, при имуно-медиирани, възпалителни, неопластични заболявания и др. На този фон, силно впечатление прави сравнително малкият брой съобщения за хормоналното влияние на жлезата върху една от основните системи, поддържащи хомеостазата на организма, а именно-хемостазата.

По-голямата част от изследванията, свързани с тимусната жлеза, я разглеждат в светлината на имунните ѝ функции. По отношение на ендокринните ефекти, по-специално тези свързани с хемостазата, наличните данни са недостатъчни. Съществуват ограничен брой проучвания, пряко свързани с хормоналните ефекти на тимусните пептиди върху процесите на тромбоцитна агрегация, коагулация и фибринолиза. Наблюденията, експериментални и клинични, най-често са извършвани върху малобройни групи, а изследваните показатели са единични. В допълнение, прилаганите тимусни препарати и екстракти (тотални или частично пречистени), не позволяват да се прецени ефекта на отделните пептиди, а що се отнася до дозата-то тя многократно е надвишавала съответната ендогенна продукция. Експерименталните и клинични данни, касаещи този проблем, са оскъдни, непълни и противоречиви и това силно затруднява интерпретацията на получените резултати. Клиничните наблюдения са провеждани на пациенти с различни заболявания, стадий на развитие, усложнения, придружаващи заболявания и терапия, което дава основание да се очаква повлияване на хемостазата. Използвани са различни експериментални модели- с тимектомия или увреждане на тимуса, които неизбежно пораждат нарушения в хемостазния профил.



Няма яснота по въпроса дали тимусните пептиди оказват директни ефекти върху хемостазните показатели, или тези ефекти са опосредствани от имунните и противовъзпалителните им функции.

Изложените факти, правят актуална идеята за провеждане на комплексно фармако-физиологично проучване на ефектите на тимусните пептиди- тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, приложени на интактни животни и в малки дози, върху хемостазата, в частност, върху хемокоагулацията.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО**

### **ЦЕЛ**

Да се проучат ефектите на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, върху коагулацията у плъхове.

### **ЗАДАЧИ**

1. Да се проучи влиянието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху интегрални показатели на хемостазата и ранни маркери на хемокоагулацията.
2. Да се изследва влиянието на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху основните плазмени фактори на хемокоагулация по вътрешната система.
3. Да се проучат ефектите на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин бета-4 върху пусковия механизъм на коагулационната каскада по външната система.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **1. Експериментални животни и условия**

За целта на експерименталното проучване бяха използвани 52 бели мъжки плъха, порода Wistar, от които 39 опитни и 13 контролни, с тегло 200-220 гр. Животните бяха отглеждани при стандартни условия- поставени на естествен режим светло-тъмно 12:12 часа и достъп до храна и вода ad libitum. При работата с животните се спазваха изискванията на Европейската конвенция и Директивата на Европейския парламент за протекция на експерименталните 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 тимусните пептиди тимулин (Sigma Aldrich, USA), тимозин-алфа 1 (Sigma Aldrich, USA) и тимозин-бета 4 (Sigma Aldrich, USA). Дневната доза на тимулина беше 0,4 mg/kg, на тимозин-алфа 1-0,3 mg/kg и на тимозин-бета 4-0,3 mg/kg съответно. Дозите бяха определени въз основа на литературни данни и в предварително експериментално проучване. Пептидите се прилагаха веднъж дневно, субкутанно, в три последователни дни.

### **3. Експериментални групи- структуриране и приложение на тимусните пептиди**

При всяко наблюдение, експерименталната група животни се разделяше на четири подгрупи: първа подгрупа (контролна)- инжектираше се с физиологичен разтвор, разтворител на хормоните; втора подгрупа-

инжектираше се с тимулин; трета подгрупа- инжектираше се с тимозин-алфа 1; четвърта подгрупа- инжектираше се с тимозин-бета 4.

Използваните вещества бяха във вид на субстанция и се разтваряха *ex tempore*. Приложението на пептидите се осъществяваше *s.c.*, еднократно ежедневно, в интервала 08.00-09.00 часа, в три последователни дни, в периода на пролетното равноденствие. Контролната група се третираше с физиологичен разтвор, по начин, идентичен на опитните групи. Продължителността на наблюдението беше 72 часа.

#### **4. Получаване на плазма и съхраняване**

От плъховете, под уретанова наркоза чрез кардиална пункция, осъществявана с еднократна спринцовка, беше вземана кръв (4,5 ml) с антикоагулант, в отношение 9:1. В болшинството от случаите, като антикоагулант се използваше натриев цитрат 0.11 mmol/l. Специален антикоагулантен разтвор се използваше за определяне на фибринопептид А (разтвор, съдържащ цитрат, хепарин, хирудин, апротинин и натриен азид).

Центрофугирането се извършваше за 10 минути при 3000 оборота/мин., а плазмата (супернатантът) се отделяше и съхраняваше при 4° C в хемостазни епруветки. Част от изследваните параметри (аРТТ, РТ) се определяха не по-късно от втория час след нейното отделяне, а за останалите показатели плазмата се замразяваше при -60° C и определянето се извършваше в рамките на десет дни.

#### **5. Хистологично изследване**

След вземане на кръв, животните бяха аутопсирани и огледани макроскопски за кръвоизливи. За установяване на микрокръвоизливи и вътресъдово

съсирване, от вътрешните органи (бъбрек, черен дроб, стомах, слезка) бяха приготвени препарати, оцветени с хематоксилин-еозин и Weigert за фибрин.

## **6. Хемостазни показатели**

Включените в настоящия дисертационен труд хемостазни показатели се основават на един от посочените по-долу методи: кинетични и ELISA.

### *Кинетични методи*

Това са стандартни, рутинни методи, при които след темпериране се отчита времето от добавяне на реактив, инициращ коагулацията, до появата на първите фибринови нишки, определено по фотооптичен метод (Н. Veeser, 1988; Н. Gonnaes, М.К. Fagerhol, 1975). Активността на плазмените фактори от II до XII се изразява в проценти или международни единици. За тези проучвания бяха използвани коагулометри COAG-MATE XM и STAG<sup>®</sup> и реактиви на Diagnostica Stago (France) и Dade Behring (USA).

### *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) методи*

Същността на ензимно-свързаните имуносорбентни методи се свежда до „сандвич техника“, като се използват няколко реагента. Реагент 1 представлява моноклонални антитела, в повечето случаи се използват миши такива, които се свързват със съответния антиген в пробата (в случая показател на хемостазата). Реагент 2 (пероксидаза) се свързва с комплекса „реагент 1+антиген“, като по този начин се формира „сандвич“ (P.J. Declerck et al., 1988). Изследва се оптична плътност на пробите, а концентрациите на изследваните параметри се изчисляват чрез софтуера на ELISA-рийдъра по стандартни криви, получени от разредените стандарти.

### **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 (Prtothrombin time)*, протромбиново време, определяно по кинетичен коагулометричен метод с кит на Diagnostica Stago, France;

### **6.2. Ранни маркери на хемокоагулацията:**

- *Fibrinopeptide A (Fibrinopeptide A)*, фибринопептид А, определян чрез ELISA метод с кит на American Diagnostica inc., USA;
- *PF 1+2 (Prothrombin fragment 1+2)*, протромбинов фрагмент 1+2, определян чрез ELISA метод с кит на Enzygnost, Siemens healthcare Diagnostics, Germany

### **6.3. Интринзик система- основни плазмени фактори, определяни като активност (Act):**

- *F IX: Act (Factor IX)*, фактор IX, определян чрез кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- *F X: Act (Factor X)*, фактор X, определян чрез кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- *F XI: Act (Factor XI)*, фактор XI, определян чрез кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- *F XII: Act (Factor XII)*, фактор XII, определян чрез кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA.

#### 6.4. Фактори на пусковия механизъм на екстринзич системата:

- *TF (Tissue factor)*, тъканен фактор, определян чрез ELISA метод с кит на American Diagnostica inc., USA;
- *F VII: Act (Factor VII)*, фактор VII, определян чрез кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- *Free TFPI: Ag (free tissue-factor pathway inhibitor, antigen)*, свободен инхибитор на пътя на тъканния фактор, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- *Free TFPI: Act (free tissue-factor pathway inhibitor, activity)* свободен инхибитор на пътя на тъканния активатор, активност, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France.

### 7. Статистически анализ на резултатите

Статистическата обработка на резултатите беше извършена с помощта на софтуерен продукт GraphPad Prism 5.00. Бяха изчислени относителния дял при определяне нивата на показателите, средните стойности, статистическото разсейване и статистическата грешка при определяне на средни нива на показателите.

Използваше се t-теста на Student-Fisher за оценка на статистически хипотези и 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

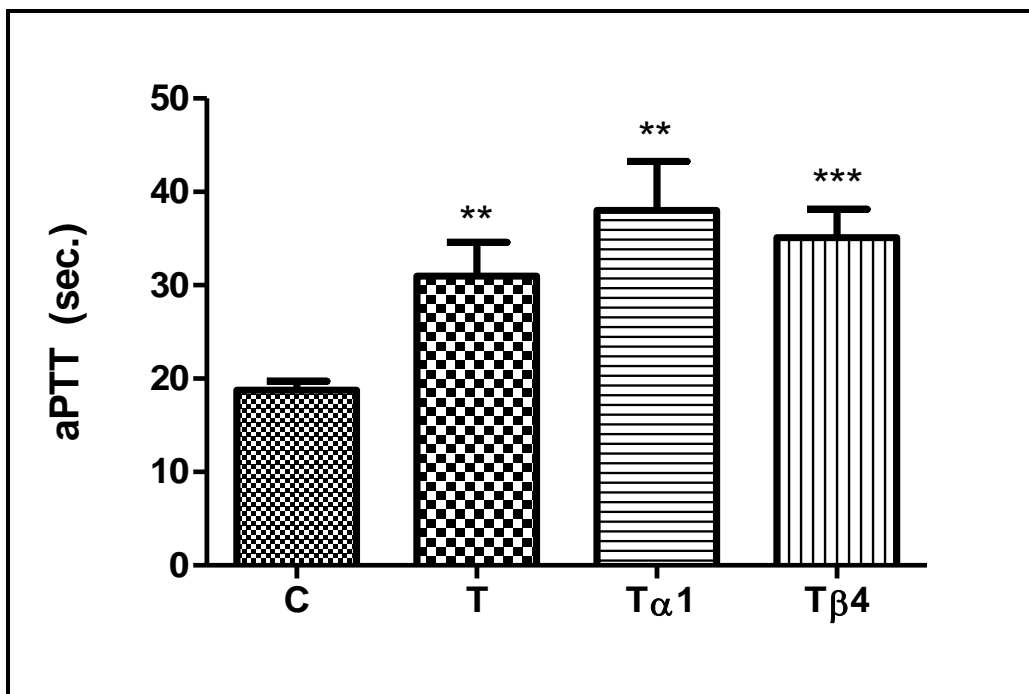
Във връзка с първата задача- да се проучи влиянието на на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху интегралните и ранните маркери на хемокоагулацията, резултатите са представени както следва:

### **1. Данни от скриниращо проучване на влиянието на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху интегралните показатели на хемостазата**

Промените в активираното парциално тромбoplastиново време (aPTT) и протромбиновото време (PT) са представени на фигури 1 и 2 и таблица 1.

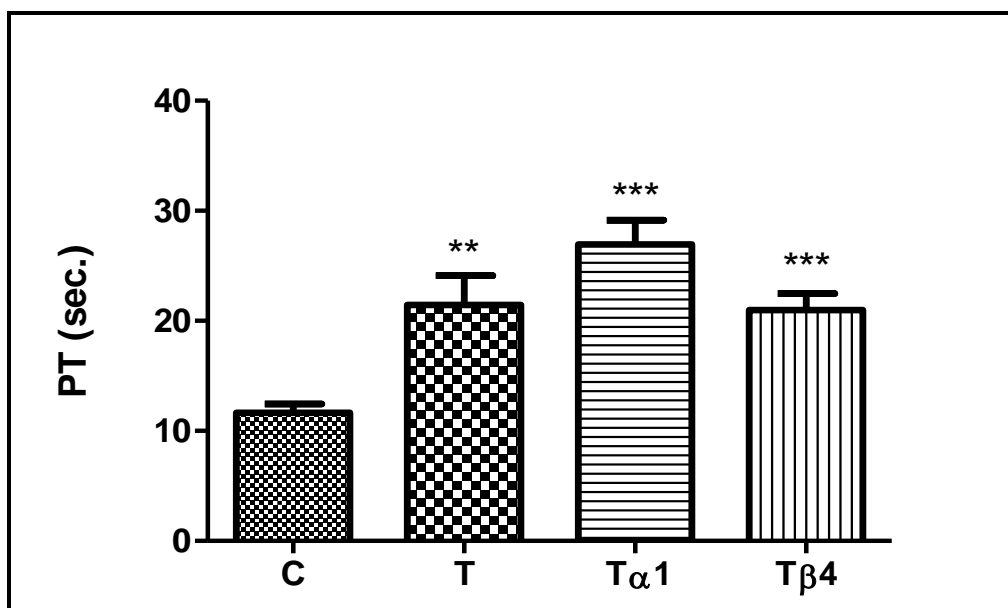
От фигура 1 е видно, че тимулинът и удължава aPTT до  $30.98 \pm 3.61$  sec. ( $p < 0.001$ ), тимозин-алфа 1- до  $38.01 \pm 5.24$  sec. ( $p < 0.001$ ) и тимозин-бета 4- до  $35.10 \pm 3.03$  sec. ( $p < 0.0001$ ), при стойност на контролната група  $18.79 \pm 0.94$  sec.





**Фигура 1.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху активирано парциално тромбoplastиново врем- aPTT. С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ .

На фигура 2 е видно, че тимусните пептиди удължават РТ както следва: тимулин- до  $21.45 \pm 2.67$  sec. ( $p < 0.001$ ), тимозин-алфа 1- до  $26.96 \pm 2.19$  sec. ( $p < 0.001$ ) и тимозин-бета 4- до  $20.99 \pm 1.50$  sec. ( $p < 0.0001$ ), при стойност на контролната група  $11.66 \pm 0.78$  sec.



**Фигура 2.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху протромбиновото време- PT. С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*- $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ .

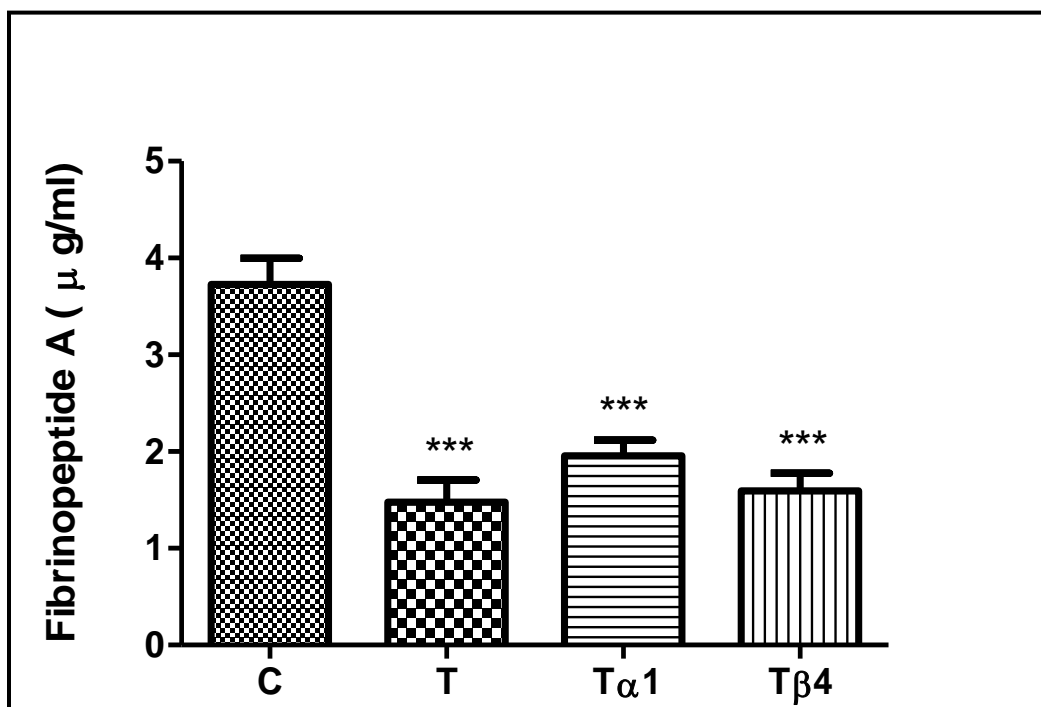
**Таблица 1 .** Ефекти на Т (0,4 mg/kg т.м.), Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху aPTT(sec.) и PT (sec.)

Инжектирано вещество	aPTT (sec.)	PT(sec.)
Т (n=13)	30.98 $\pm$ 3.61 ; $p < 0.001$	21.45 $\pm$ 2.67 ; $p < 0.001$
Т $\alpha$ 1 (n=13)	38.01 $\pm$ 5.24 ; $p < 0.001$	26.96 $\pm$ 2.19; $p < 0.0001$
Т $\beta$ 4 (n=13)	35.10 $\pm$ 3.03 ; $p < 0.0001$	20.99 $\pm$ 1.50 ; $p < 0.0001$
Физиологичен разтвор (n=13)	18.79 $\pm$ 0.94	11.66 $\pm$ 0.78

През 1964 г. Macfarlane, Davie и Ratnoff предлагат сходни модели на каскадната теория за протичането на биохимичните реакции, водещи до образуването на фибрин (Macfarlane, 1964; Davie, Ratnoff, 1964). Тези модели са в основата на изследванията на протромбиновото време (РТ) и активираното парциално тромбoplastиново време (аРТТ). Промените в РТ и аРТТ са скриниращи показатели за нарушен коагулационен статус. Определянето им е съществена част от базисните тестове, използвани широко в клиничната практика за оценка на хемокоагулацията по вътрешната и външната система (Miljic et al., 2006). Анализът на получените резултати показва, че прилагането на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, предизвиква значими промени и в двата изследвани интегрални показателя на хемостазата: аРТТ и РТ (фигури 1 и 2). Имайки предвид информацията, която дават интегралните показатели (Reddy et al., 1999; Eckman et al., 2003), удължаването на тези времена дава основание да се приеме, че използваните тимусни пептиди предизвикват тенденция към хипокоагулABILитет.

## **2. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху фибринопептид А и протромбинов фрагмент 1+2- ранни маркери на хемокоагулацията**

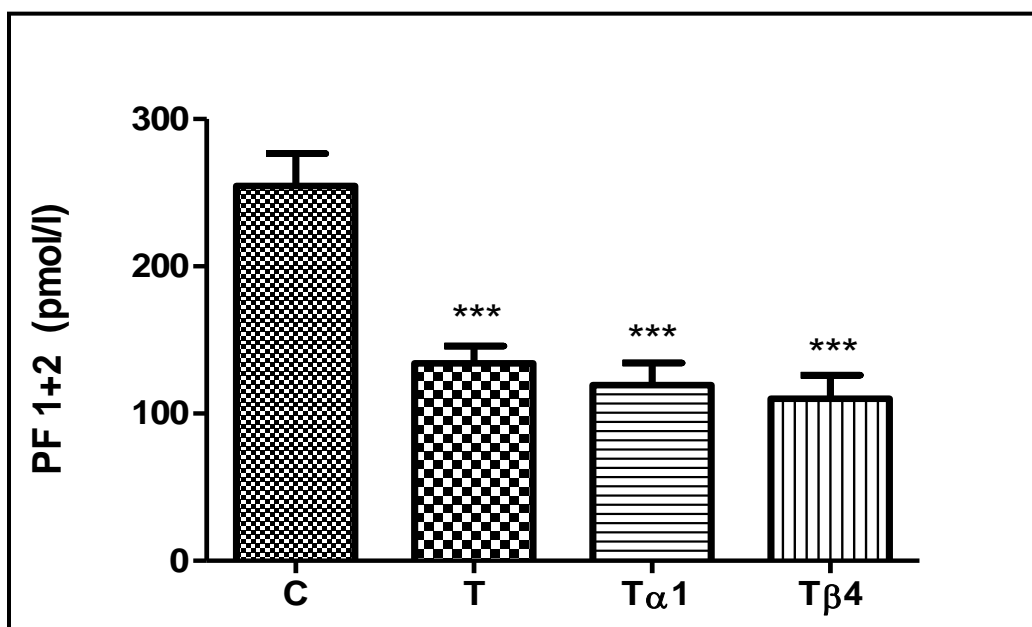
Резултатите са представени на фигури 3 и 4.



**Фигура 3.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху плазмената концентрация на фибринопептид А. С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$

На фигура 3 се вижда, плазмената концентрация на фибринопептид А е значително намалена ( $p < 0.0001$ ) под влиянието и на трите тимусни пептида-след приложение на тимулин- до  $1.476 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ , след тимозин-алфа 1- до  $1.956 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$  и след тимозин-бета 4- до  $1.593 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ , сравнено с контролната група-  $3.728 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ .

Резултатите от фигура 4 показват, че тимулинът намалява нивото на PF 1+2 до  $134.1 \pm 11.72$  pmol/l, ( $p < 0.0001$ ), тимозин-алфа 1- до  $119.4 \pm 15.02$  pmol/l ( $p < 0.0001$ ) и тимозин-бета 4- до  $110.1 \pm 15.97$  pmol/l, ( $p < 0.0001$ ), при стойности на контролната група  $254.7 \pm 21.92$  pmol/l.



**Фигура 4.** Ефекти на тимулин- T (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- T $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- T $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху плазмената концентрация на протромбинов фрагмент 1+2 (PF 1+2). C-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$

Литературните данни показват, че фибринопептид А (FP А) и протромбинов фрагмент 1+2 (PF1+2), са водещите показатели за установяване на ранни нарушения в хемостазния статус (P.C. Liaw et al., 2004; H.C. Kwon et al., 2008).

Повишената концентрация на FР А пряко корелира с образуването на кръвен съсирек (Hanna et al., 2013), тъй като протеолизата на фибриногена настъпва скоро след започването на тромботичния процес. Концентрацията на PF1+2 пряко отразява трансформацията на протромбина в тромбин (Cate and Hemker, 2016) и освен като ранен маркер на активираната коагулация, се използва за и оценка на оралната антикоагулантна терапия (Tripodi et al., 1998).

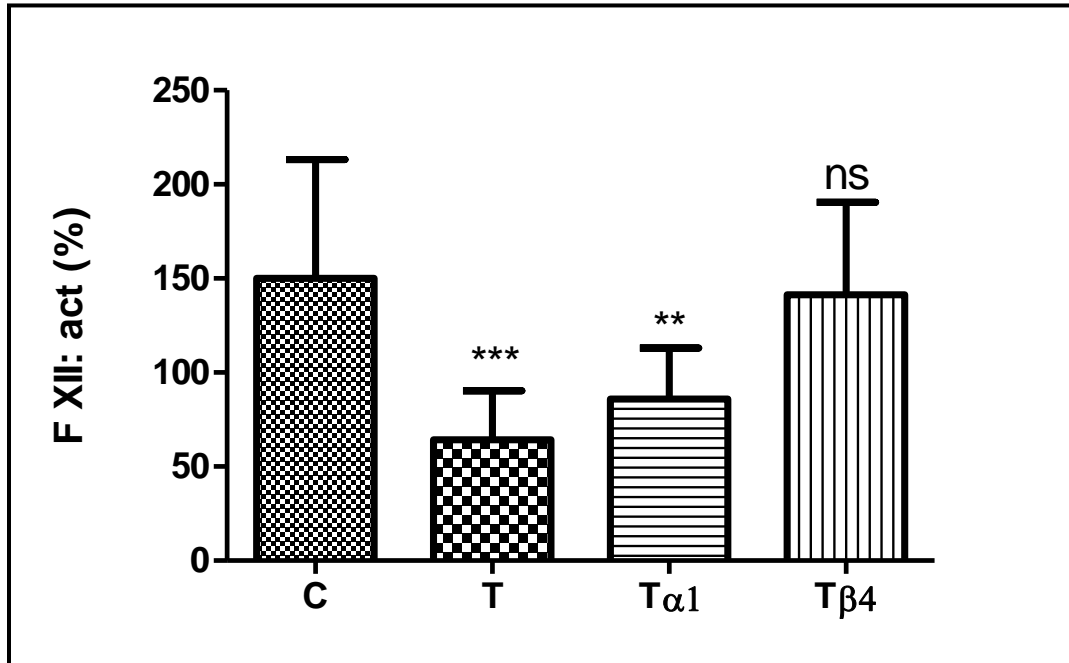
Повишени нива на FР А и PF1+2 се наблюдават както при наследствени претромботични състояния, така и при множество заболявания, асоциирани с повишен риск от венозен тромбоемболизъм (Cihan et al., 2012). Намаляване на плазмените концентрации на тези показатели се свързва с намалена съсирваемост (C.S. Vieira et al., 2007; B. Lars et al., 2011).

В настоящото проучване, прилагането на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 води до значимо понижаване ( $p < 0.0001$ ) на плазмените концентрации на FР А и PF 1+2, което свидетелства за отклоняване на коагулационния процес в посока на хипокоагулабилитет.

### **3. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху основните плазмени фактори на хемокоагулацията по вътрешната система**

За да бъде изяснено влиянието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху хемокоагулацията по вътрешната система, бяха изследвани ефектите на пептидите върху активността на плазмени фактори XII, XI, IX и X. Резултатите са представени на фигури 5-8.

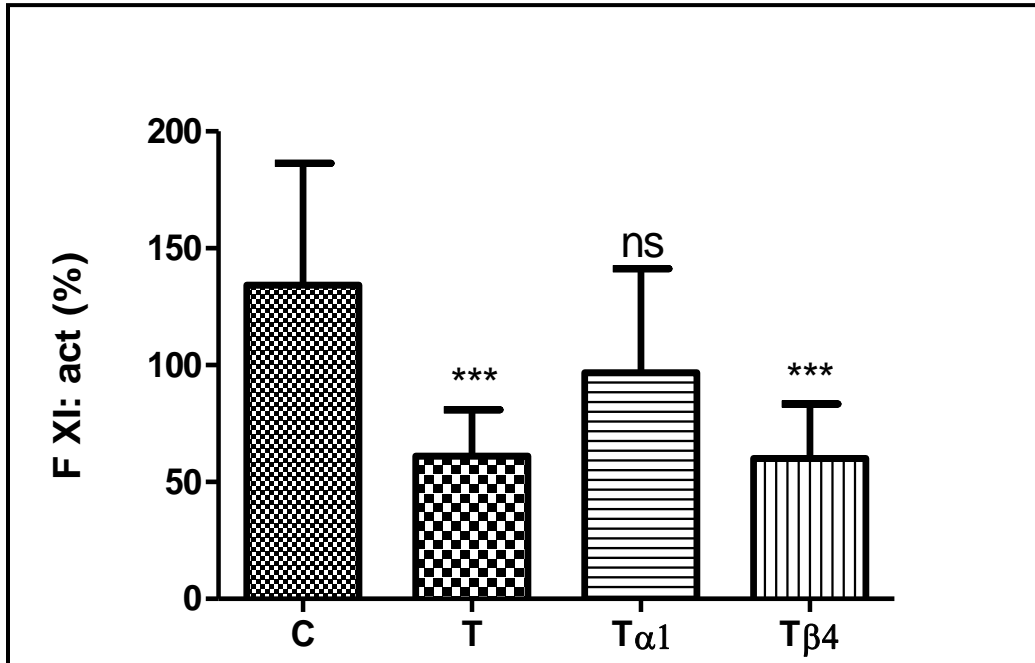
Фиг. 5 представя промените в активността на FXII, изразени в проценти. След приложението на тимулин и тимозин-алфа 1, активността е значително намалена (съответно до  $64.18 \pm 7.25$  ( $p < 0.0001$ ) и  $85.92 \pm 7.49$  ( $p < 0.001$ )). Тимозин-бета 4 не предизвиква съществени промени в този показател ( $141.3 \pm 13.66$ ), сравнено с контролната група-  $150.2 \pm 17.51$ .



**Фигура 5.** Промени в активността на FXII (%) след тимулин-T (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- T $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- T $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни. C-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ , ns - nonsignificant.

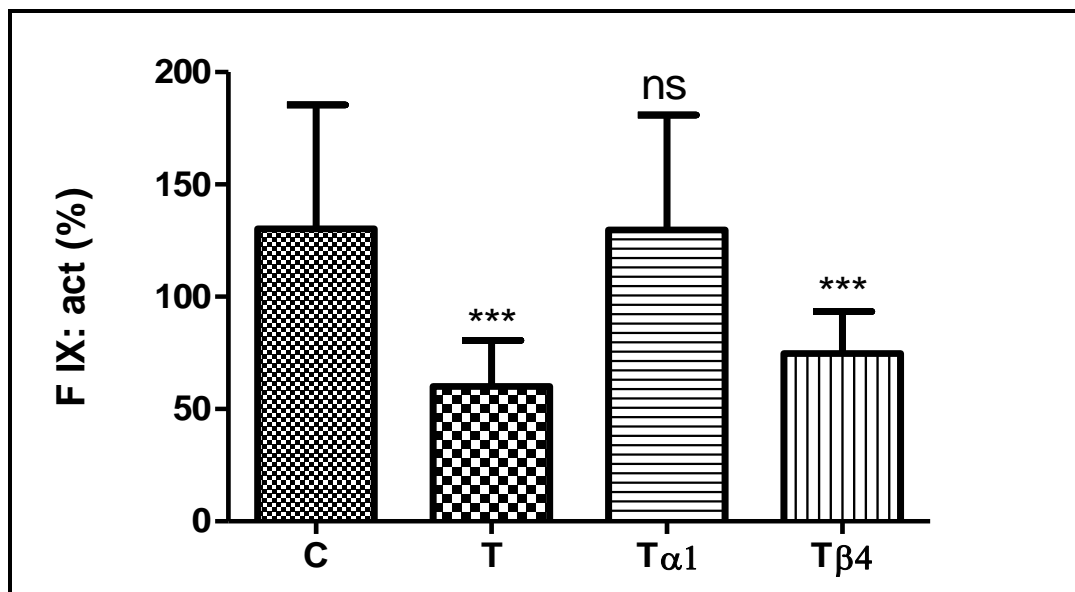
На фиг. 6 се вижда, че активността на FXI е значително намалена до  $61.09 \pm 5.49$  ( $p < 0.0001$ ) след приложение на тимулин и до  $60.08 \pm 6.49$  ( $p < 0.0001$ ) след приложение на тимозин-бета 4. Тимозин-алфа 1 не предизвиква значима промяна-  $96.83 \pm 12.32$ , в сравнение с контролната група-  $134.3 \pm 14.47$ .

Сходен резултат се наблюдава и при изследване на активността на FIX (фиг.7), която намалява съответно до  $60.09 \pm 5.67$  ( $p < 0.0001$ ) (за тимулин) и  $74.83 \pm 5.16$  ( $p < 0.0001$ ) (за тимозин-бета 4), сравнено с контролата -  $130.2 \pm 15.32$ , а прилагането на тимозин-алфа 1 не води до съществена промяна -  $129.7 \pm 14.23$ .



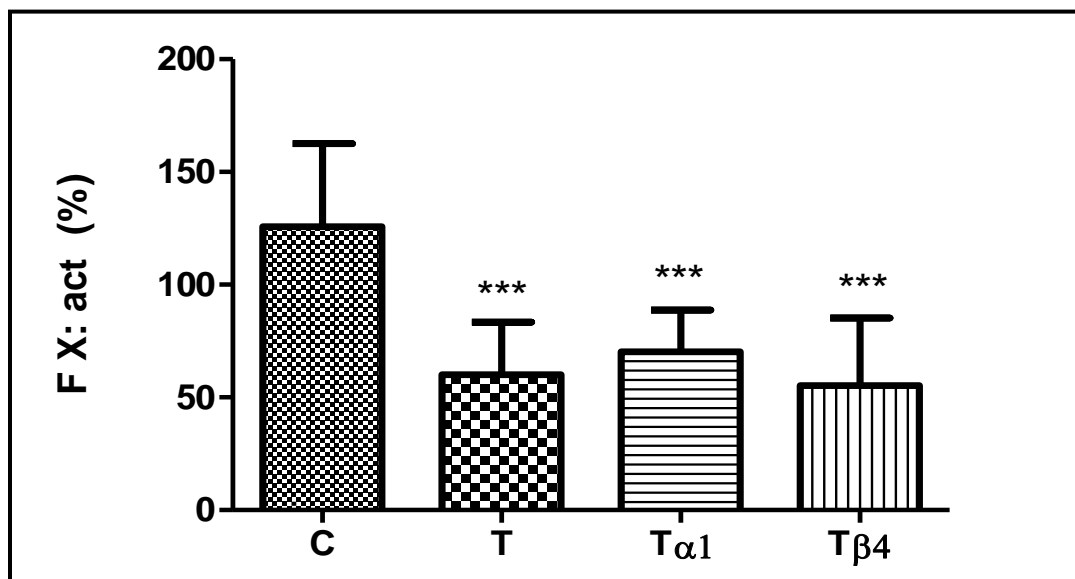
**Фигура 6.** Динамика на активността на FIX (%) след тимулин-T (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- T $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- T $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни. C-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ , ns-nonsignificant.





**Фигура 7.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Tα1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Tβ4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху активността на FIX (%). С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ , ns - nonsignificant.

От фиг.8 е видно, че и трите пептида предизвикват значимо намаляване на активността на FX, съответно до  $60.03 \pm 6.50$  ( $p < 0.0001$ ) за тимулин,  $70.31 \pm 5.10$  ( $p < 0.0001$ ) за тимозин-алфа 1 и  $55.17 \pm 8.36$  ( $p < 0.0001$ ) за тимозин-бета 4, при стойности на контролната група  $125.7 \pm 10.26$ .



**Фигура 8.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху активността на FX (%). С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ .

Известно е, че активирането на FXII е първата стъпка от коагулационната каскада по вътрешния път, което определя неговото значение за един от базисните коагулационни тестове-аРТТ (Murray et al., 1999). Приложението на тимулин и тимозин-алфа 1 (фиг.5), предизвиква силно намаляване на активността на FXII, което е доказателство за инхибиране на началото на коагулационния процес.

Тридневното третиране на мъжки плъхове с тимусните пептиди, предизвиква еднопосочни промени в активността на FXI и FIX (фиг.6 и 7), което дава важна допълнителна информация за механизма на развитие на хипокоагулABILитет чрез интринзич системата (Gailani and Renne, 2007).

Необходимо е да се отбележи, че FIXa и FXIa, участват в пътища, обезпечаващи както образуването на съсирек, така и фибринолитичната му устойчивост (Gailani and Broze, 2001). Дисрегулацията на тези пътища води до отклоняване на хемостазното равновесие и манифестиране на клинични тенденции към тромбози или хеморагии (Meijers et al., 2000). Намалената активност на фактори XI и IX под влияние на тимулин и тимозин-бета 4 ( $p < 0.0001$ ), показва потискане на коагулационния процес и предполага намалено образуване на т.нар. вътрешен теназен комплекс (FIXa/FVIIIa), играещ основна роля в активирането на FX и образуването на протромбинов активатор. Това, от своя страна, все по-ясно очертава тенденцията към намалена съсирваемост на кръвта.

Ще припомним, че дефицит или намалена/липсваща активност на фактор IX причинява хемофилия тип B,a на неговия ко-фактор, фактор VIII- хемофилия тип A, като при тежките форми, пациентите страдат от често повтарящи се, понякога животозастрашаващи кръвоизливи в ставите, мускулите и меките тъкани (Lozier and Kessler, 2005). Дефицитът/ намалената активност на фактор XI е свързан с по-леко нарушение, характеризиращо се с пост-травматични хеморагии, предимно в тъкани с висока фибринолитична активност (Salomon et al., 2006). Пациентите с дефицит/ намалена активност на фактор XII не проявяват тенденция към кръвене, дори при оперативни интервенции, независимо от значително удълженото aPTT и време на съсирване (Kaplan, 1996). FIX и FXI могат да бъдат активирани и по алтернативен път, съответно от комплекса TF/FVII и от тромбин, което обяснява липсата на хеморагична диатеза при пациентите с изолиран дефицит на FXII (Maas et al., 2010).

Плазмен фактор X е основен елемент на протромбиновия активатор и като такъв се явява ключово звено за функционирането на хемокоагулационната каскада и по двата механизма- вътрешен и външен (Girolami et al., 2015). FX може да бъде активиран както чрез екстринзич системата (TF, FVIIa, Ca<sup>2+</sup>, фософлипиди), така и чрез интринзич системата (FIXa, FVIIIa, Ca<sup>2+</sup>, фософлипиди) (Lippi et al., 2009). Дефицитът на FX е рядък, но се характеризира с една от най-тежките клинични картини, като често се наблюдава кървене от меките тъкани, централната нервна система, гастроинтестиналният тракт, епистаксиси, менорагия (Daforopoulos et al., 2003).

В настоящото изследване, активността на FX е значително намалена ( $p < 0.0001$ ) под влияние и на трите тимусни пептида (фиг.8). Фактор X представлява главен елемент в общия краен път на коагулационната каскада, водещ до образуване на кръвен съсирек. Описаните промени в активността му дават основание да приемем, че използваните в това проучване тимусни пептиди силно повлияват коагулацията и предизвикват хипокоагулабилитет, без наличие на микро- или макроскопски хеморагии.

Понижената активност на основните фактори на хемокоагулацията по вътрешната система, под влиянието на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, е в съответствие с установените промени в aPTT (фиг.1) и ясно показва тенденция към намалена съсирваемост.

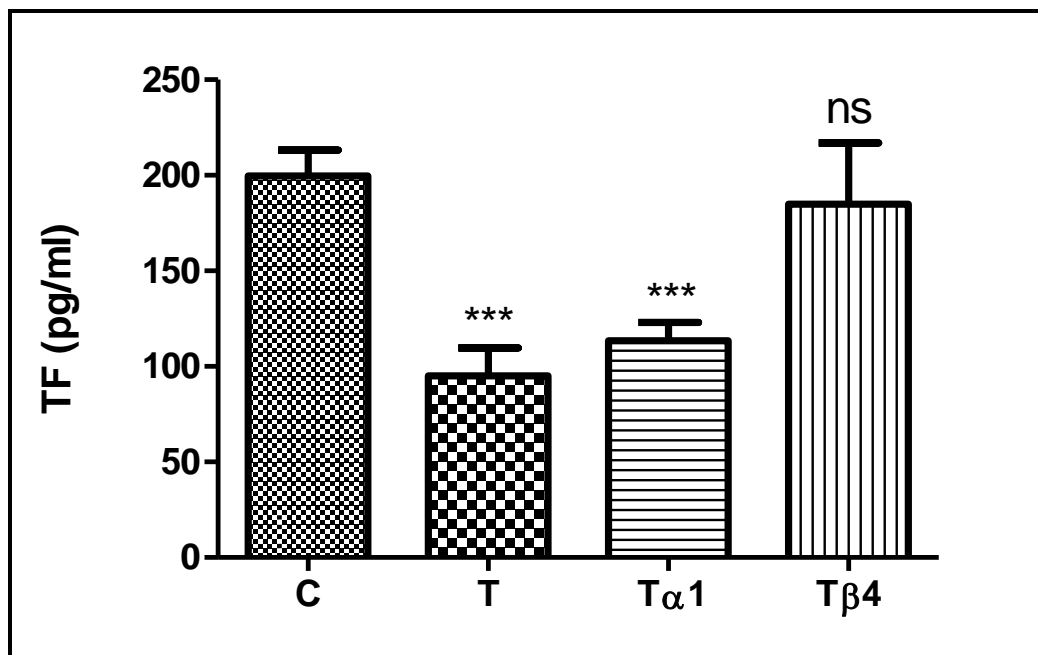
#### **4. Ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху пусковия механизъм на коагулационната каскада по външната система**

За да се проследят ефектите на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху иницирането на коагулацията по външната система,

бяха изследвани промените в концентрацията на тъканен фактор (TF), промените в активността на плазмен фактор VII, както и промените в концентрацията и активността на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор (free TFPI).

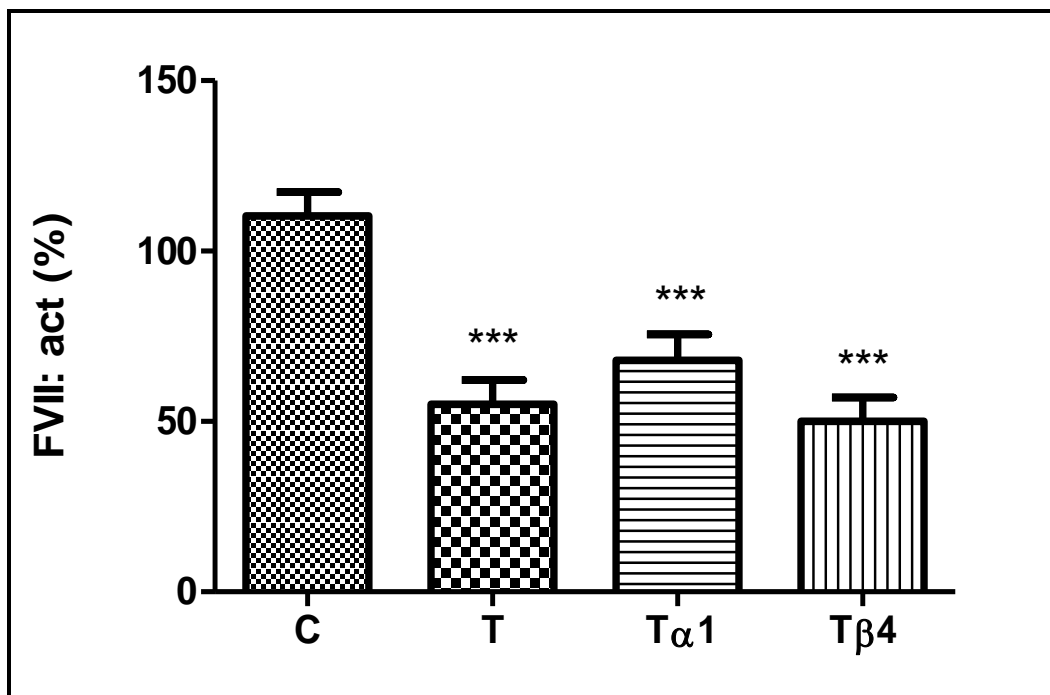
Резултатите са представени на фигури 9-12.

На фиг. 9 се вижда, че приложението на тимусните пептиди тимулин и тимозин-алфа 1, води до значително намаляване на плазмената концентрация на тъканен фактор съответно до  $95.21 \pm 14.46$  pg/ml ( $p < 0.0001$ ) и  $113.5 \pm 9.50$  pg/ml ( $p < 0.0001$ ). Приложението на тимозин-бета 4 не доведе до съществени отклонения в този показател-  $184.9 \pm 32.10$  pg/ml, сравнено с контролата-  $199.7 \pm 13.60$  pg/ml.



**Фигура 9.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху плазмената концентрация на тъканен фактор- TF (ng/ml). С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ , ns-nonsignificant.

Активността на фактор VII, (фиг. 10), е значително намалена след прилагането и на трите тимусни пептида до  $55.09 \pm 7.04$  ( $p < 0.0001$ ),  $67.91 \pm 7.63$  ( $p < 0.0001$ ) и  $50.06 \pm 7.01$  ( $p < 0.0001$ ) съответно за тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, при стойности на контролната група  $110.4 \pm 6.96$ .



**Фигура 10.** Динамика на активността на FVII (%) след тимулин- T (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- T $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- T $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни. C-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$

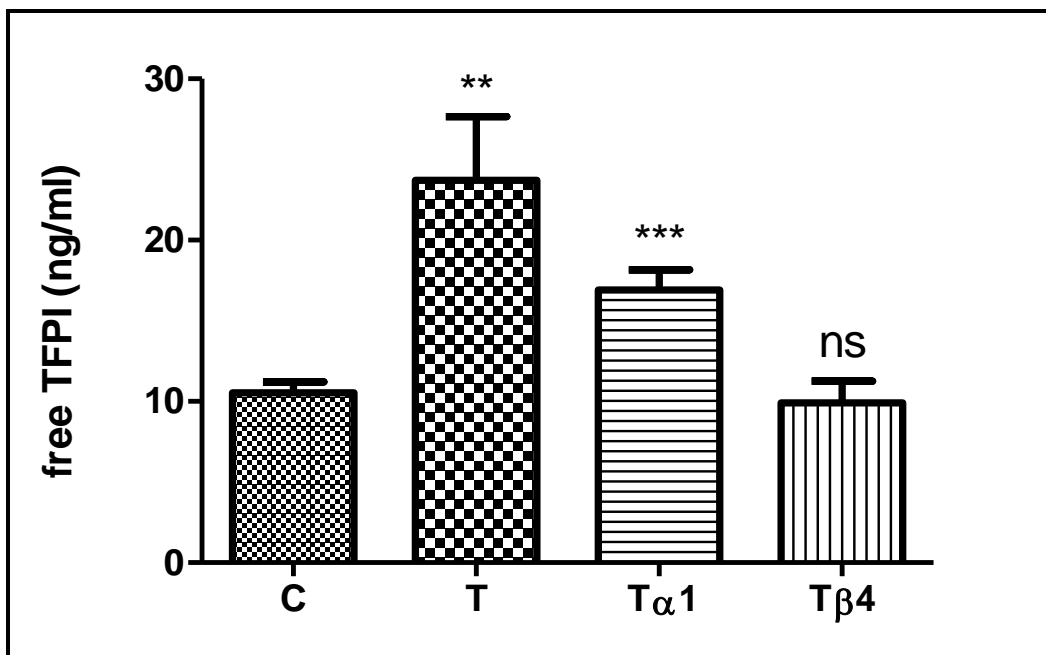
Ниските нива на TF, както и прилагането на анти-TF-антитяло, водят до масивни кръвоизливи в белите дробове, сърцето, мозъка, тестисите (Maskman, 2008). Прилагането на тимусните пептиди тимулин и тимозин-алфа 1, води до значително намаляване ( $p < 0.0001$ ) на плазмената концентрация на TF (фиг. 9). Доколкото TF е познат преди всичко като инициращ елемент на външния път на коагулация и тромбогенеза при различни заболявания (Moons et al., 2002; Ruf et al., 2003; Kasthuri et al., 2010), би могло да се приеме, че прилагането на посочените тимусни пептиди, предизвиква тенденция към хипокоагулABILитет.

Що се отнася до вродения дефицит на FVII, данните показват тенденция към хеморагии (Wu et al., 2014), с предилекционни места в ставите, меките тъкани и мускулите, по подобие на хемофилия А и В (Tuddenham et al., 1995; Bugge et al., 1996). Рекомбинантен фактор VII се прилага успешно като терапевтично средство при редица състояния, чиято клинична изява са трудно овладяващи се кръвоизливи (Hedner, 2006). Експерименталните данни показват, че повишената експресия на FVIIa води до тромбози и преждевременна смърт (Aljamali et al., 2008). Сигнификантно намалената активност на FVII след приложението на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, в комбинация с намалената концентрация на тъканен фактор, позволява да допуснем, макар и спекулативно, намалено образуване на комплекса TF/FVIIa. Имайки предвид есенциалната роля на този комплекс в хемостазата, приемаме, че намалената концентрация и активност на елементите му, са част от механизма, обясняващ тенденцията към хипокоагулабилитет. Това предположение се подкрепя от получените от нас данни за силно удълженото протромбиново време, под влиянието на използваните тимусните пептиди (фиг.2).

На фиг. 11 и 12 са представени ефектите на тимусните пептиди съответно върху плазмената концентрация и активността на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор (free TFPI).

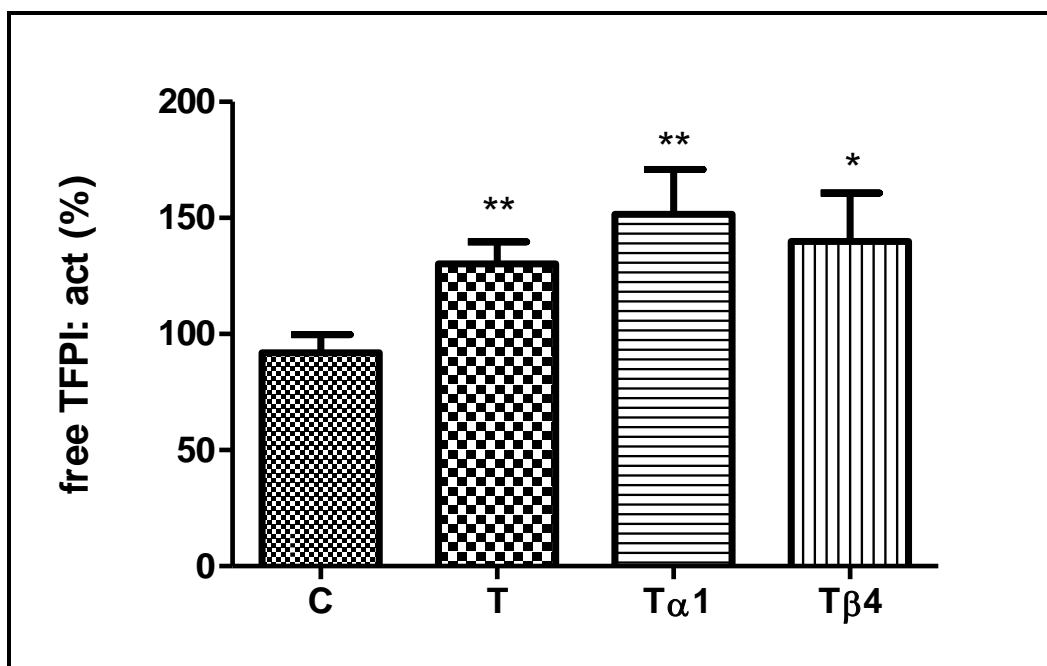
Тимулин и тимозин-алфа 1 предизвикват значимо повишаване на плазмената концентрация на free TFPI до  $23.70 \pm 3.95$  ng/ml ( $p < 0.001$ ) и  $16.92 \pm 1.23$  ng/ml ( $p < 0.0001$ ), а прилагането на тимозин-бета 4 не я повлиява съществено ( $9.902 \pm 1.37$  ng/ml), в сравнение с контролната група-  $10.54 \pm 0.65$  ng/ml.





**Фигура 11.** Ефекти на тимулин-Т (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни, върху плазмената концентрация на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор- free TFPI (ng/ml). С-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$ , ns - nonsignificant.

От фиг. 12 е видно е, че активността на TFPI е значително увеличена след приложението и на трите пептида (до  $130.3 \pm 9.49$  за тимулин, до  $151.6 \pm 19.24$  за тимозин-алфа 1 и до  $139.9 \pm 20.85$  за тимозин-бета 4), сравнено с контролната група ( $91.88 \pm 7.94$ ).



**Фигура 12.** Динамика на активността на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор- free TFPI (%) след тимулин- T (0,4 mg/kg т.м.), тимозин-алфа 1- T $\alpha$ 1 (0,3 mg/kg т.м.) и тимозин-бета 4- T $\beta$ 4 (0,3 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, еднократно дневно, в три последователни дни. C-контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*- $p < 0.01$ , \*\*-  $p < 0.001$ .

Добре известно е, че инхибиторът на пътя на тъканния фактор (TFPI), потиска хемокоагулацията чрез блокиране на активността на комплекса TF/FVIIa (Ellery and Adams, 2014) и на протромбиназия комплекс (Mast, 2016). Клиничната изява на повишеното плазмено ниво на TFPI, включва чести кръвонасядания, менорагия и животозастрашаващо кървене след травма или оперативна интервенция (Kuang et al., 2001). Блокирането на активността на TFPI, възстановява тромбиновото образуване по външния път и нормализира хемостазата (Hilden et al., 2012). Фармакологични агенти, намаляващи TFPI-активността, се използват при лечението на хемофилия (Chowdary et al., 2015). В настоящото проучване, прилагането на два от

пептидите- тимулин и тимозин-алфа 1, има за резултат повишаване на плазмената концентрация на free TFPI (фиг.11), докато неговата активност е значително повишена след третиране на плъховете с трите тимусни пептида (фиг.12). Предвид механизма на действие на TFPI, представените резултати обясняват и промените в активността на FVII (фиг. 10).

Описаните промени в концентрацията и активността на TFPI, под действието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, са още едно доказателство в подкрепа на твърдението, че изброените пептиди предизвикват хипокоагулABILитет чрез потискане на пусковия механизъм на екстринзич системата.

## **5. Заключение обсъждане**

При обобщаването на резултатите от проучването на ефектите на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху хемокоагулацията, е необходимо да се подчертае, че изследването беше проведено върху здрави, мъжки плъхове, порода Wistar. Животните бяха третирани с ниски фармакологични дози, максимално близки до физиологичните.

За реализиране на първата поставена задача, бяха изследвани промените в две групи показатели-интегрални показатели на хемостазата (aPTT и PT) и ранни маркери на хемокоагулацията (FP A и PF 1+2).

Особено голямо значение за цялостния ход на проучването, имаха резултатите, илюстриращи ефектите на тимусните пептиди върху интегралните показатели на хемостазата-aPTT и PT, които бяха силно удължени под влиянието и на трите пептида (фиг.1 и 2). Имайки предвид, че aPTT е показател, зависещ от факторите, участващи във вътрешната система

за образуване на протромбинов активатор (Reddy et al., 1999), а PT зависи от факторите, участващи във външната система за образуване на протромбинов активатор (Eckman et al., 2003), може да се приеме, че приложените пептиди значимо удължават времето за образуване на този активатор по двете системи на хемокоагулация- вътрешна и външна. Тези промени свидетелстват за нарушаване на хемостазния баланс в посока на хипокоагулабилитет и послужиха като отправна точка при формулирането на следващите задачи от нашето изследване.

Ефектите на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, бяха изследвани и върху ранни маркери на хемокоагулацията- FP A и PF 1+2. Резултатите показаха, значимо намаляване на концентрацията и на двата показателя, под действието на тимусните пептиди (фиг. 3 и 4). FP A и PF 1+2, са водещите показатели за установяване на начални нарушения в хемостазния статус (P.C. Liaw et al., 2004; H.C. Kwon et al., 2008). FP A е един от първите показатели, показващ нарушение на коагулацията, тъй като протеолизата на фибриногена настъпва скоро след започването на тромботичния процес. PF 1+2 също е сред ранните маркери на активираната коагулация (Tripodi et al., 1998). Концентрацията му е един от най-важните показатели на коагулационния статус, тъй като пряко отразява трансформацията на протромбина в тромбин (Cate and Nemker, 2016). Намаляване на плазмените концентрации на тези показатели, се наблюдава при намалена съсирваемост на кръвта (C.S. Vieira et al., 2007; B. Lars et al., 2011). Следователно, има основание да се приеме, че това е ново, специфично доказателство, в подкрепа на изказаното вече твърдение, че тимусните пептиди, използвани в настоящото изследване, предизвикват хипокоагулабилитет.

За да бъде изяснено влиянието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху вътрешната система на хемокоагулация, бяха изследвани ефектите на пептидите върху активността на плазмени фактори XII, XI, IX и X.

Активирането на FXII е първата стъпка от иницирането на коагулационната каскада по вътрешния път, откъдето следва, че значимото намаляване на активността на този фактор, под влиянието на тимулин и тимозин-алфа 1 (фиг.5), е доказателство, макар и косвено, за инхибиране на коагулационния процес по този път, на етап стартиране.

Тридневното третиране на мъжки плъхове с тимусните пептиди, предизвика сходни промени при факторите XI и IX (фиг.6 и 7), като тяхната активност беше значително намалена. Това говори за потискане на коагулацията и на един по-късен етап, свързан с образуването на т.нар. вътрешен теназен комплекс (FIXa/FVIIIa), пряко свързан с формирането на протромбинов активатор. Нещо повече, тези елементи на интринзик системата, факторите IX, VIII и XI, участват в пътища, обезпечаващи както образуването на съсирек, така и неговата фибринолитична устойчивост (Gailani and Broze, 2001). Дисрегулацията на тези пътища води до нарушаване на хемостазното равновесие (Meijers et al., 2000).

Плазмен фактор X е ключово звено за функционирането на хемокоагулацията и по двете системи- вътрешна и външна (Girolami et al., 2015). В настоящото изследване, активността му е силно намалена, под влияние и на трите тимусни пептида (фиг.8). Предвид главната роля на фактор Xa в общия краен път на коагулационната каскада, описаните промени в активността му, дават основание да приемем, че използваните в това проучване тимусни пептиди, силно повлияват съсирването в посока на хипокоагулABILитет.

Понижената активност на основните пускови фактори на хемокоагулацията по вътрешната система, под влиянието на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, обяснява наблюдаваните промени в аРТТ (фиг.1), т.е. тенденцията към хипокоагулабилитет.

За реализиране на третата поставена задача- да се изследва влиянието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху пусковия механизъм на хемокоагулацията по външната система, бяха проучени ефектите на тимусните пептиди върху концентрацията на тъканния фактор (TF), активността на плазмен фактор VII и концентрацията и активността на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор (free TFPI).

Прилагането на тимулин и тимозин-алфа 1, доведе до значително намаляване на плазмената концентрация на TF (фиг. 9). Доколкото TF е познат преди всичко като инициращ елемент на външния път на коагулация и тромбоза при различни заболявания (Moons et al., 2002; Ruf et al., 2003; Kasthuri et al., 2010), приемаме, че прилагането на посочените тимусни пептиди, предизвиква тенденция към хипокоагулабилитет.

Прилагането на трите пептида значително потиска активността на плазмен фактор VII (фиг. 10). Този ефект на пептидите, в комбинация с понижената концентрация на TF, позволява да допуснем, макар и спекулативно, намалено образуване на теназния комплекс TF/FVIIa. Предвид есенциалната роля на комплекса TF/FVIIa в хемостазата, приемаме, че намалената концентрация и активност на елементите му, са част от механизма, обясняващ тенденцията към хипокоагулабилитет. Това предположение се подкрепя от получените от нас данни, за силно удълженото протромбиново време, под влиянието на използваните тимусни пептиди (фиг.2).

Ефектите на тимулин и тимозин-алфа 1 върху плазмената концентрация на TFPI, се изразяват в силно увеличаване на неговата концентрация (фиг.11), а по отношение на активността- и трите пептида имат стимулиращ ефект (фиг.12).

Добре известно е, че един от начините, чрез които TFPI потиска хемокоагулацията, е като блокира активността на комплекса TF/FVIIa (Ellery and Adams, 2014). Предвид механизма на действие на TFPI, представените резултати обясняват и промените в активността на фактор VII. Клиничната изява на повишеното плазмено ниво на TFPI, включва различни форми на кървене: кръвонасядания, менорагия, епистаксиси, пост-травматични хеморагии (Kuang et al., 2001). Описаните промени в концентрацията и активността на TFPI под действието на тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, са поредно доказателство в подкрепа на твърдението, че изброените пептиди предизвикват хипокоагулABILITET.

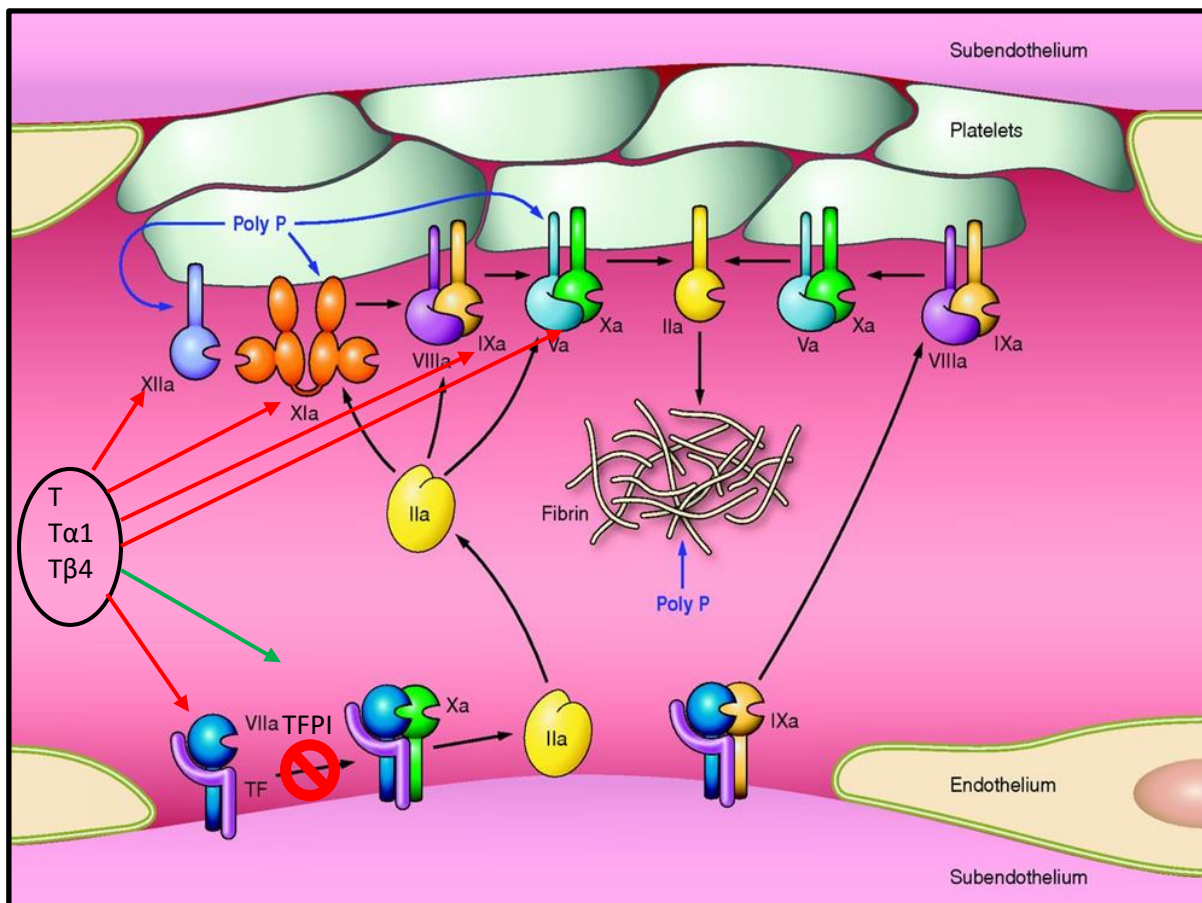
Известно е, че основна роля в производството на плазмени фактори на съсирването има черният дроб (Kasuda et al., 2011; Heinz, Braspenning , 2015). Според наличните данни, до този момент не са били идентифицирани чернодробни рецептори за тимусни пептиди, което по всяка вероятност означава, че тези пептиди осъществяват своите ефекти по индиректен механизъм. Редица проучвания демонстрират, че тимусът има важна роля в поддържането на различни чернодробни функции, в това число метаболизиращата му активност, анти-оксидативните способности и запазването на интегритета на биомембраните на чернодробните клетки (Li et al., 1991). Има не малко данни, че ефектите на тимуса върху черния дроб не се осъществяват директно, а чрез половите хормони, а не рядко чрез цялата

хипоталамо-хипофизо-гонадната ос (Li et al., 1993), като се наблюдават ясно разграничими полови различия (Li et al., 1991a; Li et al., 1991b; Li et al., 1992a). Трудно бихме могли да интерпретираме тези факти, за определяне на точния механизъм, чрез който тимусните пептиди потискат активността на плазмените фактори на съсирването. Предвид централното място на тимуса във взаимоотношенията между нервната, ендокринната и имунната система (Thyaga, Priyanka, 2012), логично е да се предположат и регулаторни ефекти на тези системи върху хемокоагулацията. В тази връзка, има достатъчно на брой, при това убедителни данни, че тимусът повлиява класическите невро-ендокринни оси, в това число хипоталамуса, хипофизата и периферните ендокринни жлези (Daneva, Spinedi et al., 1995; Goya, Console et al., 2001; Savino W, Dardenne M, 2000; Marković L, 2004). В допълнение, тимусните пептиди регулират концентрацията на ключови хемокини и цитокини (Besedovsky, del Rey, 1991; Banks et al., 1995; Dinarello, 2010), като по този начин оказват влияние върху централните звена, имащи отношение към регулацията на коагулацията (Haddad, 2008; Geenen, 2012).

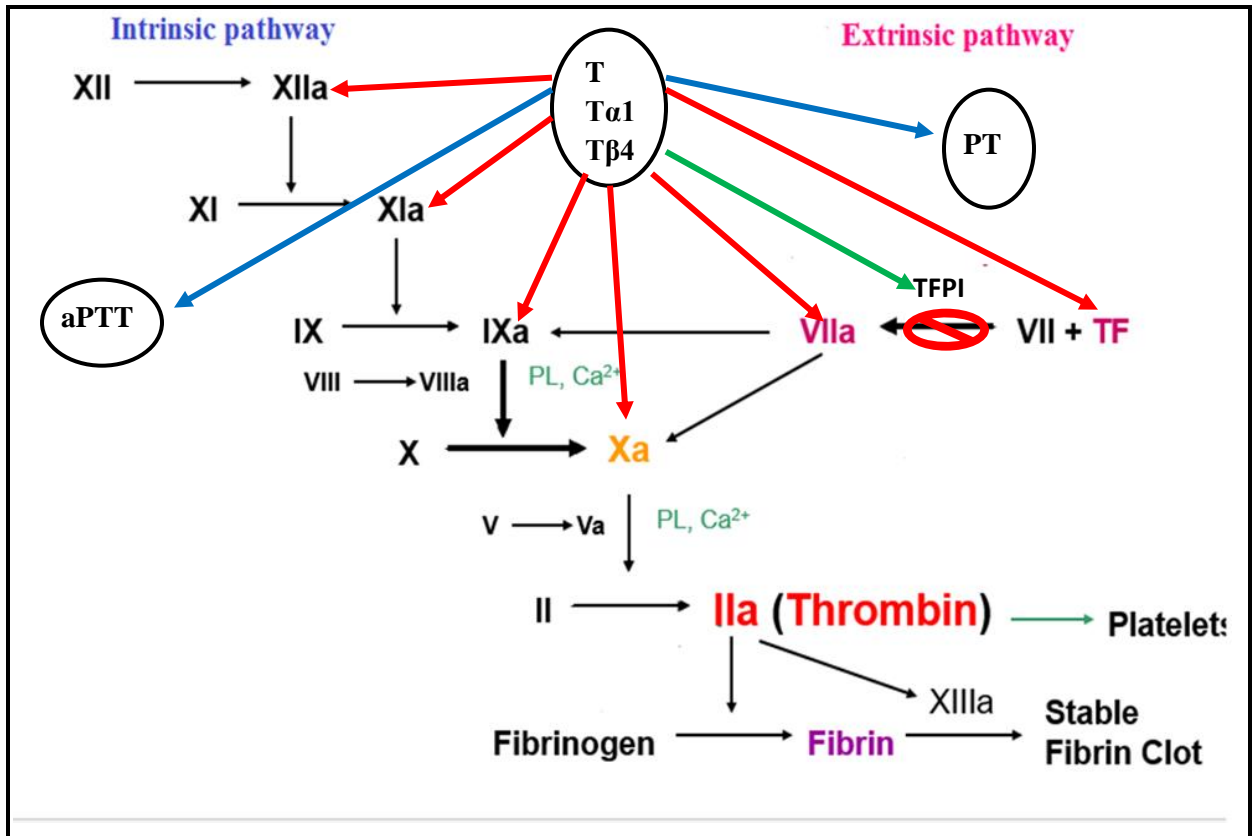
Наличието на адренергични и пептидергични нервни влакна в тимуса (Torkhovskaya, Belova et al., 2015), позволява да се допусне влияние на невропептидите върху основни процеси в тимусната жлеза, включително Т-лимфоцитната матурация, цитокиновата и хормонална продукция. Има данни, макар и единични и противоречиви, че тимусните пептиди и/или цитокините, контролирани от тях, повлияват мозъчни структури, като е възможно крайният ефект да намери израз в нарушаване на хемостазното равновесие (Roggero, Besedovsky, del Rey A., 2011).



Описаните до тук ефекти на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 върху хемокоагулацията, са илюстрирани в обобщен вид на фигури 13 и 14.



**Фигура 13.** Ефекти на тимулин-Т, тимозин-алфа-  $T\alpha 1$  и тимозин-бета 4-  $T\beta 4$  върху плазмените фактори на коагулационната каскада по интринзич и екстринзич системата. Червени стрелки- потискане, зелена стрелка- активирание.



**Фигура 14.** Ефекти на тимулин-Т, тимозин-алфа 1- Т $\alpha$ 1 и тимозин-бета 4- Т $\beta$ 4 върху плазмените фактори на коагулационната каскада по интринзик и екстринзик системата, протромбиновото време- PT и активираното парциално тромбoplastиново време- aPTT. Червени стрелки- потискане, зелена стрелка-активиране, сини стрелки- удължаване.

Резултатите от настоящото изследване, недвусмислено показват, че тимусната жлеза има отношение към поддържането на хемостазния баланс на организма и че прилагането на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа-1 и тимозин-бета 4, води до развитие на ясна тенденция към хипокоагулABILитет. Широкият терапевтичен потенциал на разгледаните тимусни пептиди и използването им при различни заболявания, дават основание да се допусне необходимостта от лабораторен контрол на хемостазата при тези пациенти.

Необходими са допълнителни проучвания, за да бъдат установени точните, интимни механизми, чрез които тимусът повлиява хемостазните процеси, в частност хемокоагулацията.

## ИЗВОДИ

1. Тридневното приложение на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, върху интактни мъжки плъхове Wistar, предизвика значимо удължаване на aPTT и PT, което е доказателство за нарушено хемостазно равновесие, с тенденция към хипокоагулабилитет.
2. Значимото намаляване на плазмените концентрации на FP A и PF 1+2, под влияние на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, е израз на инхибиране на кръвосъсирването на ранен етап.
3. Тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 значимо инхибират пусковия механизъм на хемокоагуацията по външната система, като намаляват концентрацията на TF и активността на FVII, а концентрацията и активността на TFPI са значимо повишени.
4. Тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4 потискат кръвосъсирването по вътрешната система, видно от значимо намалената активност на плазмени фактори XII, XI, IX и X.

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

Получените резултати имат оригинален характер.

1. Настоящият дисертационен труд е първо по рода си фармако-физиологично проучване на ефектите на тимусните пептиди тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, приложени в ниски фармакологични дози, върху хемокоагулацията у интактни плъхове.
2. Установено е, че тимусните пептиди- тимулин, тимозин-алфа 1 и тимозин-бета 4, предизвикват у плъхове ясна тенденция към хипокоагулабилитет.
3. Показано е, че развитието на хипокоагулабилитет, е резултат от потискане на всички етапи на образуване на протромбинов активатор, както по вътрешната, така и по външната система.
4. Установено е, не само мястото на действие на тимусните пептиди в коагулационната каскада, но се изяснява и част от механизма на развитие на хипокоагулабилитет.
5. Все по-честото използване на тимусните пептиди като терапевтични средства, при това в дози, много по-високи от експерименталните, дава основание да се допусне необходимостта от прецизен лабораторен контрол на хемостазата при тези пациенти.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Nyagolov Y., Hristozov K., **Hachmeryan A.** Significant inhibition of the triggering mechanism of the extrinsic system of blood coagulation in rats by thymus peptides thymulin, thymosin alpha 1 and thymosin beta 4. Scripta Scientifca Medica 2017; 49(2):37-42.
2. Negrev N., Hristosov K., **Hachmeryan A.**, Nyagolov Y. Thymus peptides (thymulin, thymosin alpha 1 and thymosin beta 4) inhibiting effects on the intrinsic blood coagulation pathway in rats. J of IMAB 2017; Jul-Sep;23(3):1641-1645.
3. **Hachmeryan A.**, Negrev N., Nyagolov Y. Hypocoagulability in rats induced by thymic peptides: thymulin, thymosin alpha 1 and thymosin beta 4. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences 2017 (in press).

