

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА
Медицински факултет**

**КАТЕДРА ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ
УНС ПО ФИЗИОЛОГИЯ**

ДОЦ. Д-Р НЕГРИН НЕСТОРОВ НЕГРЕВ, Д.М.

**ТИРОИДНАТА ХОРМОНАЛНА
ОС - ЗНАЧИМ РЕГУЛАТОР НА
ХЕМОСТАЗАТА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за присъждане на научна степен
“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”**

**Научна специалност: Физиология на животните и човека,
шифър – 01.06.17**

Официални рецензенти:

**Чл.-кор. проф. д-р Радомир Радомиров, д.м.н.
Проф. д-р Александър Стойнев, д.м.н.
Проф. д-р Димитър Терзииванов, д.м.н.**

ВАРНА, 2012

Дисертационният труд е написан на 179 страници и съдържа 64 фигури и 5 таблици. Библиографската справка включва 348 заглавия, от които 8 на кирилица и 340 на латиница.

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

Защитата на дисертационния труд ще се състои на
2012 г. от часа в III аудитория (ет. 4) на Медицински университет
– Варна, ул. Марин Дринов, № 55.

СЪДЪРЖАНИЕ

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО	10
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	11
1. Експериментални животни, използвани хормони и дози	11
2. Експериментални групи и третиране с хормони	12
3. Получаване на плазма и съхраняване	12
4. Хистологично изследване.....	13
5. Хемостазни показатели	13
5.1. Интегрални показатели на хемостазата:.....	13
5.2. Тромбоцити – брой, процент включен ⁷⁵ Selenomethionine (⁷⁵ Se-M) и функционална активност.....	14
5.3. Плазмени показатели (Фактори) на хемокоагулацията – определяни като антигенна концентрация (Ag):	14
5.4. Плазмени показатели (Фактори) на хемокоагулацията – определяни като активност (Act):	15
5.5. Тъканен фактор и фактор на von Willebrand:	16
5.6. Ранни маркери на хемокоагулация:	16
5.7. Показатели на антикоагулантната система:	16
5.8. Показатели на фибринолитичната система:	18
5.9. Статистически анализ на резултатите	20
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	21
1. Данни от скриниращо проучване на влиянието на тироидната хормонална ос върху хемостазата.....	21
2. Ефекти на хормоните на тироидната ос:	26
а) ефекти върху броя на тромбоцитите и процента включен ⁷⁵ Se-M в новообразуваните тромбоцити.....	26
б) ефекти върху функционалната активност на тромбоцитите.....	29
3. Влияние на тироидната хормонална ос върху коагулационната система и ранните маркери на нейната активност	32
4. Ефекти на хормоните на тироидната ос върху антикоагулационната система на хемостазата.....	51

5. Влияние на тироидната хормонална ос върху плазменото ниво и активност на основните маркери на фибринолитичната система на хемостазата.....	64
6. Заключително обсъждане	78
ИЗВОДИ	86
НАУЧНИ ПРИНОСИ.....	88
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	90
ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	95
ИМПАКТ ФАКТОР	97

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

TRH	– тиротропин-освобождаващ хормон
TSH	– тироид-стимулиращ хормон
T₃	– трийодтиронин
T₄	– тироксин
β-TG	– β-тромбоглобулин
PF 4	– тромбоцитен фактор 4
aPTT	– активирано парциално тромбoplastиново време
PT	– протромбиново време
TT	– тромбиново време
RT	– рептилазно време
EL	– време на еуглобулиновата лиза
PAP: Ag	– плазмин / α ₂ -антиплазмин комплекс, антиген
t-PA: Ag	– тъканен тип активатор на плазминогена, антиген
PAI-1: Act	– инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1, активност
FDP	– фибрин-деградационни продукти, концентрация
D-dimer	– Д-димер, концентрация
TAFI: Act	– тромбин-активируем инхибитор на фибринолизата, активност
sEPCR: Ag	– разтворима форма на ендотелен протеин С рецептор, антиген
aPC: Ag	– активиран протеин С, антиген
AT: Ag	– антиромбин III, антиген
TAT	– тромбин / антиромбин III комплекс, концентрация
PF 1+2: Ag	– протромбинов фрагмент F 1+2, антиген
vWF: Ag	– фактор на фон Вилебранд, антиген
vWF: Rco activity	– фактор на фон Вилебранд – ристоцетинова активност
TF	– тъканен фактор, концентрация

ВЪВЕДЕНИЕ

Хемостазата (кръвоспирането), в широкия смисъл на това понятие, представлява основен защитен биологичен механизъм, който предпазва организма от хеморагии и тромботични събития, обезпечава течното състояние на кръвта. Системата на хемостазата участва в поддържането на относителното постоянство на вътрешната течна среда (S. Degen, 1995). В хемостазата са ангажирани клетки на кръвта, ендотелни клетки, фактори и рецептори от тези клетки, фактори и рецептори на субендотелното и интерстициалното пространство, тъканни фактори, плазмени фактори на съсирващата, антикоагулантната и фибринолитичната системи, инхибитори, активатори и кофактори на горните фактори, както и техни инхибитори и активатори. Процесът на хемокоагулация е фаза на хемостазата и представлява многостъпална каскада от ензимни реакции, които се характеризират най-общо с последователно активиране на коагулационни фактори чрез лимитирана ензимна хидролиза, вследствие на което се получават активиран фактор (най-често серинова протеаза) и пептидни остатъци, които в клиничната практика са чувствителни показатели за активиране на определени стъпала на хемокоагулационната каскада. В тази сложна мрежа от ензимни реакции водещи до формиране на неразтворим фибрин се обособяват няколко фази: а) образуване на протромбинов активатор; б) превръщане на протромбина в тромбин; в) превръщане на фибриногена във фибрин. Активирането на протромбина, респективно образуването на фибрин може да се получи по два главни пътя: вътрешен и външен. Външният път се активира след попадане в циркулиращата кръв на екзогенни за кръвта продукти, получени в резултат на разрушаване на тъкани, съдържащи тъканен фактор, който образува комплекс с плазмения фактор VII и го активира. Вътрешният път се тригерира след увреждане на ендотела и експозиция на субендотелното

пространство, което води до създаване на условия за контакт с плазмен фактор XII. Едновременно с активирането на хемокоагулацията се активират други две условно обособени системи, действащи в противоположна посока: системите на антикоагулация и фибринолиза. Активността и на трите системи подлежи на прецизен контрол. В регулацията на тези процеси са ангажирани сложни нервни и хуморални механизми, осигуряващи баланса и равновесието на гореспоменатите фактори. Те са пряко свързани и с поддържане на течното състояние на кръвта, а също така с активиране на хемостазата в една или друга посока, както при нарушаване целостта на съдовата стена, така и при промени в състава на кръвта, или промени в кръвния ток (M. M. Hoffman, 2003; L. A. Norris, 2003; J. M. Stassen et al., 2004; M. M. Hoffman, D. M. Monroe, 2005).

Връзката между тироидната дисфункция и хемостазата е отдавна установена, на основата преди всичко на голям брой клинични проучвания. В обобщен вид, данните са силно противоречиви, дори при едно и също заболяване на щитовидната жлеза – хипо- или хипертироидизъм. Те варират от незначителни нарушения на хемостазните показатели, до клинично изявени хеморагични усложнения и фатални тромбози.

Противоречиви са данните получени и при експериментални проучвания. Те са извършвани на различни животни с модели за хипо- или хипертироидизъм, или след тироидектомия с последващо субституиращо третиране с T_3 или T_4 . Тези експериментални модели предизвикват хормонален дисбаланс и метаболитни нарушения, които отключват реакции от верижен тип, в това число и нарушения в хемостазния профил.

Видно е, че литературните данни са аргумент в полза на необходимостта от комплексно фармако-физиологично проучване, при което да се изследват ефектите на хормоните на цялата тироидна ос (тиротропин-освобождаващ хормон – TRH, тироид-стимулиращ хормон –

TSH, T₃ и T₄) върху хемостазата, приложени в малки дози на интактни животни.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

ЦЕЛ

Да се проучи влиянието на хормоните на тироидната ос (тиротропин – освобождаващ хормон, тироид-стимулиращ хормон, трийодтиронин и тироксин) върху хемостазата у плъхове.

ЗАДАЧИ

За постигане на тази цел бяха набелязани следните експериментални задачи:

1. Да се осъществи скриниращо проучване на влиянието на тироидната хормонална ос върху хемостазата.
2. Да се проучат ефектите на хормоните на тироидната ос както следва:
 - а) ефекти върху броя на тромбоцитите и процента включен ⁷⁵Selenomethionine в новообразуваните тромбоцити;
 - б) ефекти върху функционалната активност на тромбоцитите.
3. Да се проучи влиянието на тироидната хормонална ос върху коагулационната система и ранните маркери на нейната активност.
4. Да се изследват ефектите на хормоните на тироидната ос върху антикоагулационната система на хемостазата.
5. Да се проучи влиянието на хормоните на тироидната ос върху плазменото ниво и активност на основните маркери на фибринолитичната система на хемостазата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ, ИЗПОЛЗВАНИ ХОРМОНИ И ДОЗИ

Експерименталните проучвания бяха проведени върху 1027 бели мъжки плъха, порода Wistar, от които 810 опитни и 217 контролни. Плъховете бяха с тегло 170-220 гр. и отглеждани при стандартни условия, с режим 12 часа светло – 12 часа тъмно, храна и вода ad libitum.

За целта на проучването бяха използвани всички хормони, които формират тироидната ос, а именно: тиротропин-освобождаващ хормон (Thyrotropin releasing hormone, acetate salt, Sigma, minimum 97 %), волски тироид-стимулиращ хормон (bovine Thyroid stimulating hormone, activity of 2 IU/mg Sigma), трийодтиронин (Triiodothyroninum, VEB Berlin-Chemie, Germany) и тироксин (Thyroxin, Levothyroxinum, VEB Berlin-Chemie, Germany).

Направената литературна справка не дава отговор на въпроса: в какви дози следва да се използват тези хормони за експериментални цели. Това наложи провеждане на собствени проучвания, които доказаха необходимостта от използване на две работни дози за три от хормоните (както е показано по-долу), в зависимост от поставената цел.

Първата доза, а именно: тиротропин-освобождаващ хормон (TRH) – 0.2 mg/kg т.м., тироид-стимулиращ хормон (TSH) – 1 IU/kg т.м., трийодтиронин (T_3) и тироксин (T_4) – по 2 mg/kg т.м., се прилагаше за осъществяване на изследвания, произтичащи от *Задача 2а*.

Втората доза, представена от TRH – 0.06 mg/kg т.м., TSH – 1 IU/kg т.м., T_3 и T_4 – по 0.08 mg/kg т.м., беше прилагана за експерименталните изследвания, свързани със следните задачи: 1, 2б, 3, 4 и 5.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ГРУПИ И ТРЕТИРАНЕ С ХОРМОНИ

При всяко наблюдение експерименталната група животни беше разделяна на пет подгрупи: *първа подгрупа* – инжектираше се с TRH; *втора подгрупа* – третираше се с TSH; *трета подгрупа* – инжектираше се с T₃; *четвърта подгрупа* – инжектираше се с T₄ и *пета подгрупа* (контрола) – с физиологичен разтвор, разтворител на хормоните. Всички хормони бяха във вид на субстанция и се разтваряха *ex tempore*. Както беше посочено по-горе, хормоните на тироидната ос се прилагаха в две дози, в зависимост от задачата на проучването. Приложението на хормоните се осъществяваше s.c., ежедневно – между 7.30 и 8.00 часа, в три последователни дни. Контролната група се третираше с физиологичен разтвор, по начин идентичен на хормоните. Продължителността на всяко наблюдение беше 72 часа.

3. ПОЛУЧАВАНЕ НА ПЛАЗМА И СЪХРАНЯВАНЕ

От плъхове под етерна 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, бета-тромбоглобулин, фибринопептид А и комплекса тъканен плазминогенов активатор – инхибитор на плазминогеновия активатор - тип 1.

Центрофугирането се извършваше с хладилна центрофуга при +4°C и 3000 g за 10 минути, с изключение на китовите изискващи други условия за отделяне на плазмата. Отделената плазма се съхраняваше при +4°C в

хемостазни епруветки, а определянето на показателите се извършваше двукратно в рамките на 2 часа след вземане на кръвта.

4. ХИСТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

След вземане на кръв животните бяха не само аутопсирани и извършен макроскопски оглед, но се осъществяваше и хистологичен скрининг за микрохеморагии и интраваскуларни тромбози. За целта се приготвиха препарати от вътрешни органи (черен дроб, бъбрек и черва), които се оцветяваха с хематоксилин-еозин и по Weigert за фибрин. Огледът на тези препарати на светлинен микроскоп позволяваше да се изключи наличие на микрокръвоизливи и/или вътресъдови съсиреци.

5. ХЕМОСТАЗНИ ПОКАЗАТЕЛИ

В настоящия дисертационен труд са включени 58 показатели, които са представени по групи.

5.1. 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 ;
- **RT (Reptilase time)**, рептилазно време, определяно по кинетичен коагулометричен метод с кит на Diagnostica Stago, France;

- **EL (Euglobin lysis)**, време на еуглобулиновата лиза, определено по метода на Т. Лисичков (1987) с реактиви на Националния център по хематология и трансфузиология, България.

5.2. Тромбоцити – брой, процент включен ⁷⁵Selenomethionine (⁷⁵Se-M) и функционална активност

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

Процента включен ⁷⁵Se-M в новообразуваните тромбоцити се определяше с най-често използвания в практиката метод на D. G. Penington (1969).

За функционалната активност на тромбоцитите се съдеше по плазмената коноцентрация на PF 4 (тромбоцитен фактор 4) и β -TG (β -тромбоглобулин), определяни чрез тестове на Diagnostica Stago, France.

5.3. Плазмени показатели (Фактори) на хемокоагулацията – определяни като антигенна концентрация (Ag):

- **F I (Factor I)**, фактор I (фибриноген), определян по съсирващия метод на Clause чрез STA[®] - Fib кит на Diagnostica Stago, France;
- **F II: Ag (Factor II)**, фактор II, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **F VII: Ag (Factor VII)**, фактор VII, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **F VIII: Ag (Factor VIII)**, фактор VIII, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **F IX: Ag (Factor IX)**, фактор IX, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;

- **F X: Ag (Factor X)**, фактор X, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France.

5.4. Плазмени показатели (Фактори) на хемокоагулацията – определяни като активност (Act):

- **F II: Act (Factor II)**, фактор II, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F V: Act (Factor V)**, фактор V, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F VII: Act (Factor VII)**, фактор VII, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F VIII: C (Factor VIII: C)**, фактор VIII: C, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **F IX: Act (Factor IX)**, фактор IX, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F X: Act (Factor X)**, фактор X, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F XI: Act (Factor XI)**, фактор XI, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F XII: Act (Factor XII)**, фактор XII, определян чрез стандартизиран кинетичен коагулометричен метод с тест на Dade Behring, USA;
- **F XIII: Act (Factor XIII)**, фактор XIII, определян с кинетичен хромогенен метод с тест на Berichrom[®], Marburg, Germany.

5.5. Тъканен фактор и фактор на von Willebrand:

- **TF: Ag (Tissue factor, antigen)**, тъканен фактор, антиген, определян с ELISA метод и кит на American Diagnostica inc., USA;
- **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;
- **vWF: Rco activity (Ristocetin cofactor activity)**, фактор на фон Вилебранд – ристоцетинова активност, определян по ELISA метод с кит на Date Behring, Marburg GmbH, Germany.

5.6. Ранни маркери на хемокоагулация:

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

5.7. Показатели на антикоагулантната система:

- **Antithrombin III: Ag (Antigen)**, антитромбин III, антиген, определян чрез имунотурбидиметричен метод проведен с LIATEST® AT III, Diagnostica Stago, France;

- **Antithrombin III: Act (Activity)** антитромбин III активност, определян чрез хромогенен метод и кит на Diagnostica Stago, France;
- **TAT: Ag (Thrombin-antithrombin III complex, antigen)**, тромбин/антитромбин III комплекс, антиген, определян чрез ELISA метод и кит на Enzygnost[®] microplate enzyme assay, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany;
- **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;
- **total PS: Ag (total Protein S, antigen)**, общ протеин S, антиген, определян чрез ELISA метод с Asserachrom[®] кит на Diagnostica Stago, France;
- **free PS: Ag (free Protein S, antigen)**, свободен протеин S, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **Protein S: Act (Protein S, activity)**, протеин S активност, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **Thrombomodulin: Ag (Thrombomodulin, antigen)**, тромбомодулин антиген, определян чрез IMUBIND[®] ELISA kit, American Diagnostica inc., USA;
- **sEPCR: Ag (Soluble form of endothelial protein C receptor, antigen)**, разтворима форма на ендотелен протеин C рецептор,

антиген, определяна чрез Asserachrom[®] ELISA kit, Diagnostica Stago, France;

- **Protein C: Ag (Protein C, antigen)**, протеин C, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **aPC: Ag (activated Protein C, antigen)**, активиран протеин C, антиген, определян по F. España и съавт. (2001), базиран на ELISA;
- **Protein C: Act (Protein C, activity)**, протеин C, активност, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France.

5.8. Показатели на фибринолитичната система:

- **Plasminogen: Act (Activity)**, плазминоген, активност, определян по хромогенен метод с кит на Diagnostica Stago, France, на коагулометър с хромогенен канал;
- **α_2 -antiplasmin: Act (Activity)**, α_2 -антиплазмин, активност, определян по хромогенен метод с кит на Diagnostica Stago, France, на коагулометър с хромогенен канал;
- **PAP-complex: Ag (Plasmin- α_2 -antiplasmin-complex, antigen)**, плазмин- α_2 -антиплазмин комплекс, антиген, определян по ELISA метод с кит на DRG, Marburg, Germany;
- **t-PA: Ag (Tissue-type plasminogen activator, antigen)**, тъканен тип активатор на плазминогена, антиген, определян чрез ELISA метод и кит на Diagnostica Stago, France;
- **PAI-1: Ag (Plasminogen activator inhibitor type-1, antigen)**, инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;

- **PAI-1: Act (Plasminogen activator inhibitor type-1, activity)**, инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1, активност, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **Vitronectin: Ag (Vitronectin, antigen)**, витронектин, антиген, определян по ELISA метод с кит на American Diagnostica GmbH, USA;
- **t-PA/PAI-1 complex: Ag (Tissue-type plasminogen activator/ Plasminogen activator inhibitor type-1 complex, antigen)**, тъканен тип активатор на плазминогена (t-PA) / инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1 (PAI-1) комплекс, антиген, определян чрез ELISA метод и кит на Technoclone GmbH, Vienna, Austria;
- **α_1 -antitripsin: Ag (Antigen)**, α_1 -антитрипсин, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **α_2 -macroglobulin: Ag (Antigen)**, α_2 -макроглобулин, антиген, определян чрез ELISA метод с кит на Diagnostica Stago, France;
- **Heparin Cofactor II: Ag (Antigen)**, хепаринов кофактор II, антиген, определян по хромогенен метод с кит Actichrome[®] Heparin Cofactor II, American Diagnostica inc., USA;
- **FDP (Fibrin degradation products)**, фибрин-деградационни продукти, концентрация, определяни чрез IMUCLONE[®] FDP ELISA kit, American Diagnostica inc., USA;
- **D-dimer (D-dimer)**, Д-димер, концентрация, определян чрез IMUCLONE[®] D-dimer ELISA kit, American Diagnostica inc., USA;
- **TAFI: Act (Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, activity)**, тромбин-активируем инхибитор на фибринолизата, активност, определян по хромогенен метод чрез Stachrom[®]TAFI kit, Diagnostica Stago, France;

- **TAFIa/TAFIai: Ag (Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activated/ Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor inactivated, antigen)** TAFIa (активиран)/TAFIai (инактивиран) комплекс, антиген, определян чрез ELISA метод с Asserachrom[®] TAFIa/TAFIai kit, Diagnostica Stago, France.

5.9. Статистически анализ на резултатите

Статистическата обработка на резултатите беше извършена с помощта на софтуерен продукт GraphPad Prism 4, 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 (параметричен метод) за оценка на статистически хипотези за сравняване на резултатите от различни групи в статистически равномерен комплекс. Стойностите $p < 0.05$ се считаха за статистически значими.

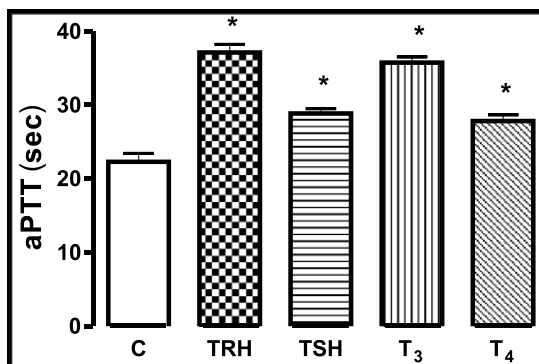
Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната ($\bar{x} \pm S \bar{x}$).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. ДАННИ ОТ СКРИНИРАЩО ПРОУЧВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА ТИРОИДНАТА ХОРМОНАЛНА ОС ВЪРХУ ХЕМОСТАЗАТА

Проучени бяха всички скриниращи показатели на хемостазата: активирано парциално тромбoplastиново време (аРТТ), протромбиново време (РТ), тромбиново време (ТТ), рептилазно време (РТ) и време на еуглобулинова лиза (ЕЛ).

От фигура 1 е видно, че хормоните на тироидната хормонална ос удължават аРТТ, както следва: TRH (тиротропин-освобождаващ хормон) – до 37.16 ± 1.05 sec ($p < 0.001$), TSH (тироид-стимулиращ хормон) – до 28.25 ± 0.66 sec ($p < 0.001$), T_3 (трийодтиронин) – до 35.74 ± 0.79 sec ($p < 0.001$) и T_4 (тироксин) – до 27.87 ± 0.82 sec ($p < 0.001$), при стойност на контролната група 22.31 ± 1.15 sec.

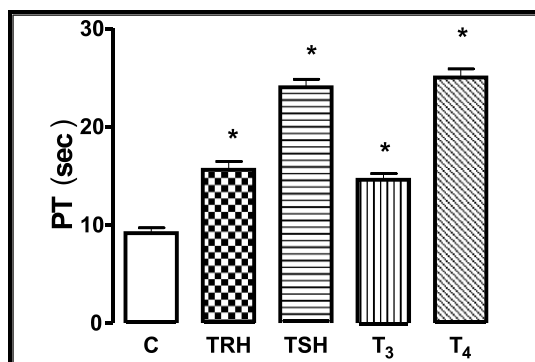


Фиг. 1. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху аРТТ (активирано парциално тромбoplastиново време).

C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

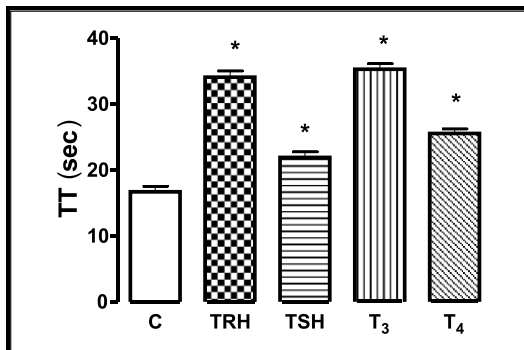
Протромбиновото време, показано на фигура 2, е удължено. При плъховете третирани с TRH неговата стойност е 15.64 ± 0.83 sec ($p < 0.001$), при третираните с TSH – 24.03 ± 0.84 sec ($p < 0.001$), при третираните с T_3 – 14.61 ± 0.62 sec ($p < 0.001$) и при третираните с T_4 – 25.05 ± 0.86 sec ($p < 0.001$). При контролната група плъхове PT беше 9.15 ± 0.55 .



Фиг. 2. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху PT (протромбиново време). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

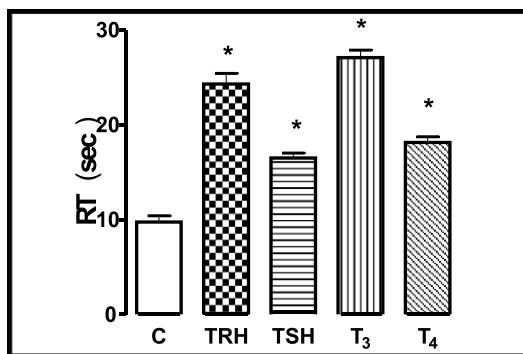
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Представеното на фигура 3 TT е силно удължено ($p < 0.001$), като при групата животни инжектирани с TRH то е 34.07 ± 0.94 sec ($p < 0.001$), при инжектираните с TSH – 21.91 ± 0.83 sec ($p < 0.001$), при инжектираните с T_3 – 35.27 ± 0.86 sec ($p < 0.001$), а при инжектираните с T_4 – 25.55 ± 0.66 sec ($p < 0.001$). Стойността на TT при контролната група животни беше 16.67 ± 0.88 sec.



Фиг. 3 Влияние върху *TT* (тромбиново време) на *TRH* – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), *TSH* – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), *T₃* – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и *T₄* – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни. *C* – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

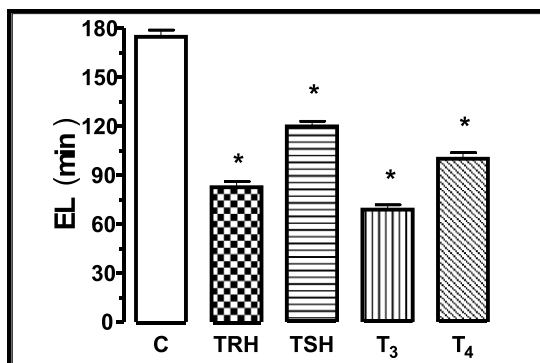


Фиг. 4. Промени в *RT* (рептилазно време) на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с *TRH* – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), *TSH* – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), *T₃* – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и *T₄* – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. *C* – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Резултатите представените на фигура 4 резултати показват, че всички хормони на тироидната ос удължават RT. TRH удължава това време до 24.32 ± 1.12 sec ($p < 0.001$), TSH – до 16.50 ± 0.53 sec ($p < 0.001$), T_3 – до 27.09 ± 0.81 sec ($p < 0.001$), T_4 – до 18.13 ± 0.62 sec ($p < 0.001$), при среднастойност на контролната група 9.76 ± 0.63 .

Времето на EL (Фигура 5) е скъсено от TRH до 82.70 ± 3.62 min ($p < 0.001$), от TSH – до 120.10 ± 3.00 min ($p < 0.001$), от T_3 – до 68.93 ± 2.97 min ($p < 0.001$) и от T_4 – до 100.10 ± 3.66 min ($p < 0.001$). При контролната група плъхове средното време на EL беше 174.90 ± 4.13 min.



Фиг. 5. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar един път дневно в три последователни дни върху EL – еуглобулинова лиза. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Анализът на резултатите от това проучване показва, че всички хормони на тироидната ос (TRH, TSH, T_3 и T_4) предизвикват значими ($p < 0.001$) и еднопосочни промени в четири от интегралните показатели на хемостазата: aPTT, PT, TT и RT (Фигури 1-4). Тези промени недвусмислено сочат, че и четирите хормона, в приложените дози и схеми при плъхове, водят до

удължаването на техните времена, което е свидетелство за повлияване на хемостазата в посока на хипокоагулабилитет. Тъй като aPTT е показател зависещ от факторите участващи във вътрешната система на образуване на протромбинов активатор, PT – зависи от факторите участващи във външната система (път) на образуване на протромбинов активатор, а TT и RT – от факторите на общия път, може да се каже, че TRH, TSH, T₃ и T₄ предизвикват тенденция към намалена съсирваемост на кръвта. Този ефект на хормоните на тироидната ос е резултат от удължаване както на времето необходимо за образуване на протромбиновия активатор (протромбинов комплекс, който включва: плазмените фактори Va и Xa, Ca²⁺ и тромбоцитен фактор 3) по двете системи – вътрешна и външна, така и на времето необходимо за превръщане на фибриногена във фибрин.

Скъсяването на петия интегрален показател – времето за еуглобулиновата лиза (Фигура 5) с еднаква значимост ($p < 0.001$) за четирите хормона е свидетелство за повишена фибринолитична активност. Данните за повишена активност на фибринолитичната система хармонизират с представената по-горе тенденция към хипокоагулабилитет и дават основание да се допусне модулиране на баланса между трите условно разграничени системи: хемокоагулационна, антикоагулационна и фибринолитична.

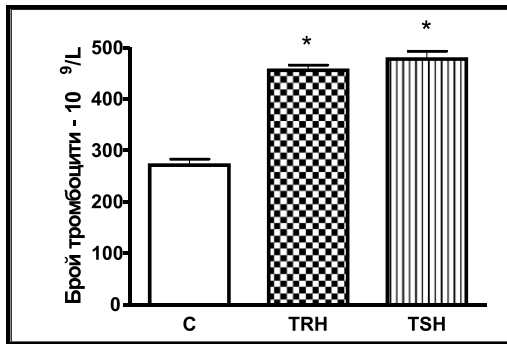
Резултатите от изследването на интегрални показатели на хемостазата, сочещи намалена съсирваемост и повишена фибринолиза, реализирани от всеки от четирите хормона поставят следните въпроси:

- Кои фактори на коагулацията, антикоагулацията и фибринолизата (активатори, инхибитори, кофактори) са повлияни?
- Какви са дискретните механизми на ефектите на изследваните хормони - директни или опосредствани?

- В каква степен установените промени в хемостазата са свързани с ефекти на хормоналното третиране върху хепатоцити, ендотелни клетки, и тромбоцити?

2. ЕФЕКТИ НА ХОРМОНИТЕ НА ТИРОИДНАТА ОС:

а) ефекти върху броя на тромбоцитите и процента включен ⁷⁵Se-M в новообразуваните тромбоцити



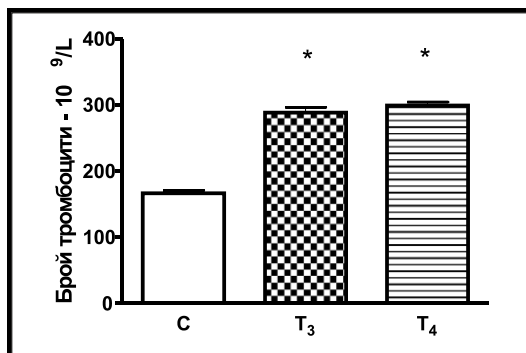
Фиг. 6. *Промени в броя на тромбоцитите у мъжки плъхове Wistar под влияние на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.) и TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), приложени s.c. един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.*

*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*

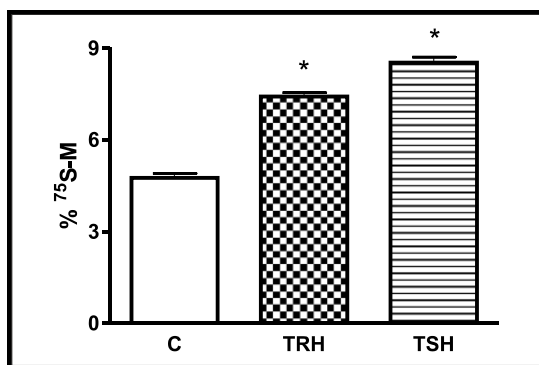
От фигура 6 е видно, че третирането с TRH увеличава броя на тромбоцитите у плъхове до $456.20 \pm 9.44 \cdot 10^9/L$ ($p < 0.001$), а TSH – до $477.80 \pm 15.46 \cdot 10^9/L$ ($p < 0.001$), спрямо контролната група ($271.50 \pm 11.60 \cdot 10^9/L$).

Резултатите от фигура 7 показват, че при плъховете инжектирани с T_3 и T_4 е налице нарастване на броя на тромбоцитите до 288.40 ± 8.14 ($p < 0.001$), и $299.50 \pm 5.00 \cdot 10^9/L$ ($p < 0.001$).

Процентът включен $^{75}\text{Se-M}$ в новообразуваните тромбоцити (Фигура 8) при контролната група плъхове е 4.75 ± 0.14 , а при опитните групи – нараства. TRH предизвиква увеличение на включения изотоп до 7.40 ± 0.12 ($p < 0.001$), а TSH – до 8.52 ± 0.17 ($p < 0.001$).



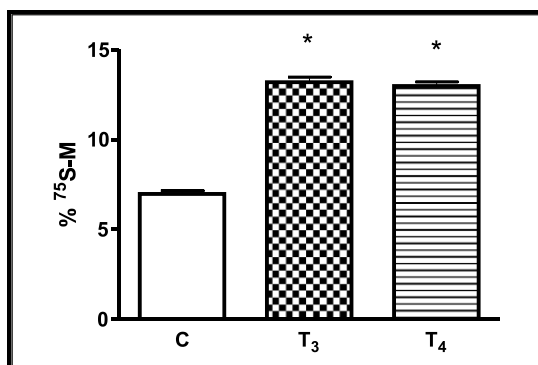
Фиг. 7. Ефекти на T₃ – трийодтиронин и T₄ – тироксин, приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar по 0.08 mg/kg т.м., един път дневно в три последователни дни върху броя на тромбоцитите. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm Sx$, * - $p < 0.001$.



Фиг. 8. Промени в процента включен $^{75}\text{Se-M}$ ($^{75}\text{Selenomethionine}$) у мъжки плъхове Wistar под влияние на TRH – тиротропин-освобождаващ

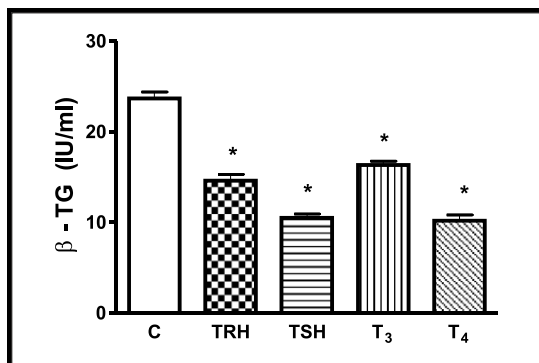
хормон (0.06 mg/kg т.м.) и TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), приложени s.c., един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

В резултат на третирането с T₃ и T₄ включеният изотоп в новообразуваните тромбоцити (Фигура 9) също се увеличава. При T₃ третираните плъхове – до 13.21 ± 0.26 ($p < 0.001$), а T₄ – до 12.98 ± 0.23 ($p < 0.001$), изчислен спрямо контролната група (6.98 ± 0.17).

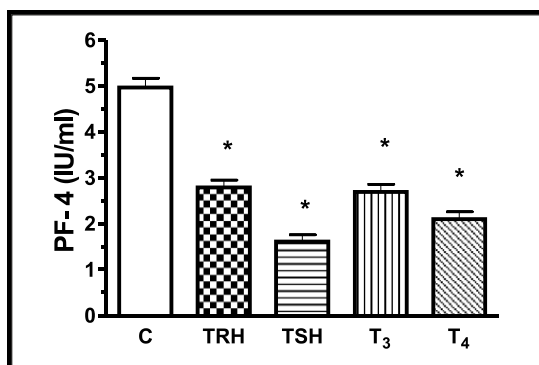


Фиг. 9. Ефекти на T₃ – трийодтиронин и T₄ – тироксин, приложени s.c. по 0.08 mg/kg т.м. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху процента включен ⁷⁵Se-M (⁷⁵Selenomethionine) в новообразуваните тромбоцити у плъхове. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

б) ефекти върху функционалната активност на тромбоцитите



Фиг. 10. *Ниво на β -тромбоглобулин у мъжки плъхове Wistar след третиране с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. един път дневно в три последователни дни. C – контролна група. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*



Фиг. 11. *Стойности на PF-4 (тромбоцитен фактор - 4) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, инжектирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*

При плъховете, третираните с TRH (Фигура 10) плазменото ниво на β -TG (β -тромбоглобулин) беше понижено до 14.58 ± 0.73 IU/ml ($p < 0.001$), при третираните с TSH – до 10.52 ± 0.40 IU/ml ($p < 0.001$), а при третираните с T_3 и T_4 както следва: до 16.35 ± 0.39 IU/ml ($p < 0.001$) и до 10.16 ± 0.66 IU/ml ($p < 0.001$). Нивото на β -TG в контролната група беше 23.68 ± 0.71 IU/ml.

Нивото на PF-4 (Фигура 11) беше понижено от TRH до 2.79 ± 0.15 IU/ml ($p < 0.001$), от TSH – до 1.61 ± 0.14 IU/ml ($p < 0.001$), от T_3 – до 2.69 ± 0.17 IU/ml ($p < 0.001$), а от T_4 – до 2.10 ± 0.15 IU/ml ($p < 0.001$). Стойността на PF-4 в контролната група беше 4.96 ± 0.19 IU/ml.

Известно е, че тромбоцитите заемат важно място в хемостазата (D.C. Baker, J. Brassard, 2011; M.Ueno et al., 2011; S. Jain et al., 2010; R.S. Kasthuri et al., 2010), което налага определяне както на техния брой, така и на тяхната функционална активност. Значимото увеличение на броя на тромбоцитите ($p < 0.001$), видно от фигури 6 и 7, дава основание да се допусне, че хормоните на тироидната ос най-вероятно стимулират тромбоцитите у плъхове. Както беше вече посочено единственият засега обективен критерий, който позволява да се прецени нивото на тромбоцитите е определяне на процента включен ^{75}Se -М в новообразуваните тромбоцити. В този смисъл, показаното на фигури 8 и 9 увеличаване включване на изотопа ($p < 0.001$) е сигурно доказателство, че TRH, TSH, T_3 и T_4 активират образуването на тромбоцити (т.е. тироидната хормонална ос е значим регулатор на тромбоцитите).

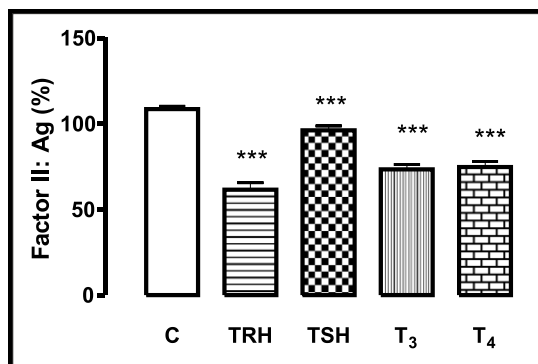
Функционалната активност на тромбоцитите се преценява, чрез определяне на плазменото ниво на β -TG и PF-4. Приема се, че тяхното ниво корелира с активността на тромбоцитите (M. Fukamu et al., 2006). Следователно, понижената концентрация на β -TG и PF-4 в плазмата на плъхове след третирането им с TRH, TSH, T_3 и T_4 ($p < 0.001$) (Фигури 10 и 11) позволява да се заключи, че хормоните на тироидната ос значимо потискат активността на тромбоцитите. Има основание да се приеме също,

че супресираната тромбоцитна активност най-вероятно е един от механизмите, посредством които TRH, TSH, T₃ и T₄ предизвикват показана в Задача 1. тенденция към хипокоагулабилитет.

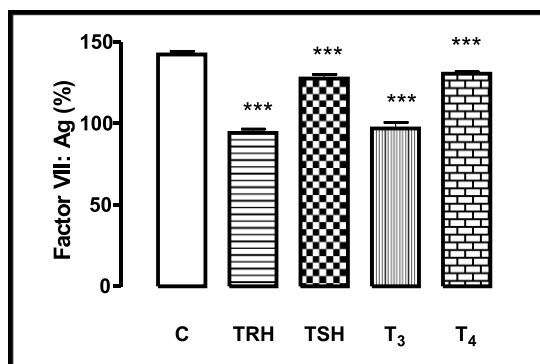
3. ВЛИЯНИЕ НА ТИРОИДНАТА ХОРМОНАЛНА ОС ВЪРХУ КОАГУЛАЦИОННАТА СИСТЕМА И РАННИТЕ МАРКЕРИ НА НЕЙНАТА АКТИВНОСТ

Във връзка с тази задача бяха осъществени няколко експериментални постановки. С първата експериментална постановка се проучи влиянието на хормоните на тироидната ос върху синтеза, секрецията и активността на витамин К-зависимите плазмени фактори на коагулацията – F II, F VII, F IX и F X.

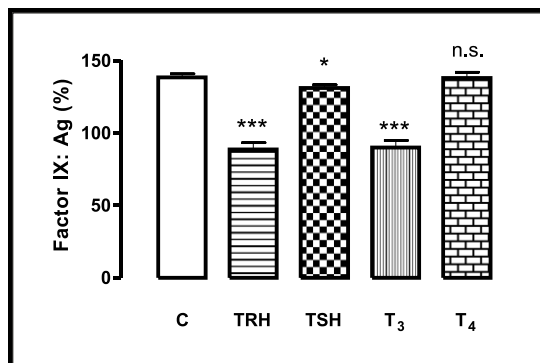
Ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху синтеза и секрецията на витамин К-зависимите коагулационни фактори бяха преценявани по тяхната антигенна концентрация. С други думи, определяше се плазмената концентрация на F II: Ag, F VII: Ag, F IX: Ag и F X: Ag. Резултатите са представени на фигури 12-15, както следва:



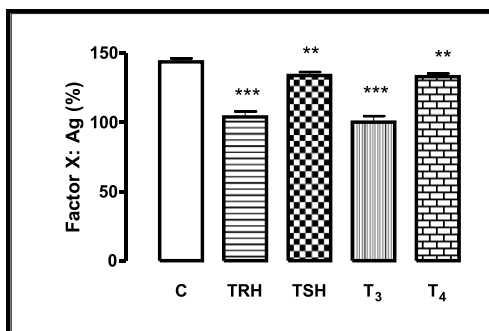
Фиг. 12. Промени в плазменото ниво на Factor II: Ag (антиген) у мъжки плъхове Wistar, след третиране с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *** - $p < 0.001$.



Фиг. 13. Промени в плазменото ниво на Factor VII: Ag (антиген) у мъжки плъхове Wistar, след третиране с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *** - $p < 0.001$.

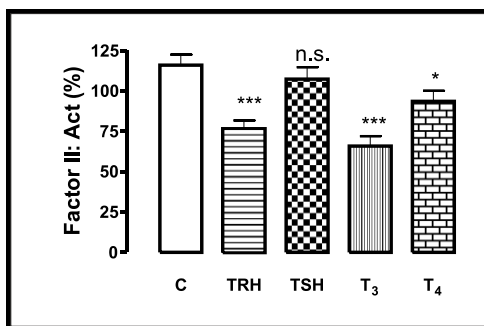


Фиг. 14. Промени в плазменото ниво на Factor IX: Ag (антиген) у мъжки плъхове Wistar, след третиране с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.

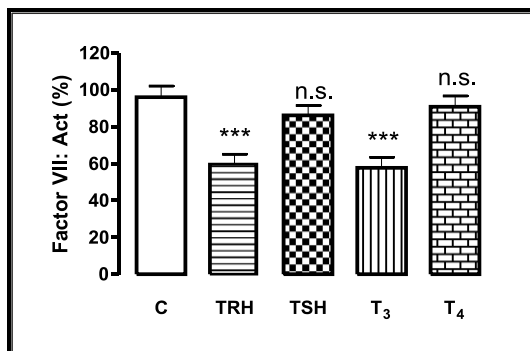


Фиг. 15. Промени в плазменото ниво на Factor X: Ag (антиген) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.

Резултатите, показващи ефектите на тироидната хормонална ос върху активността на витамин K-зависимите фактори на хемокоагулацията – F II, F VII, F IX и F X са представени на фигури 16-19.

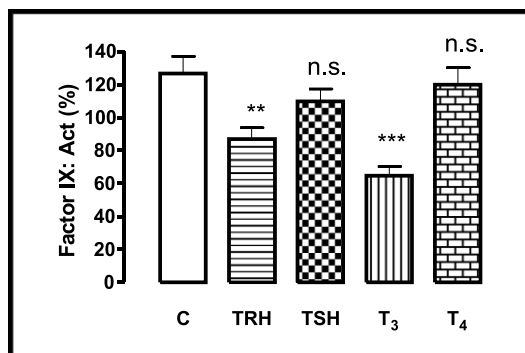


Фиг. 16. Активност на плазмен фактор II (Factor II: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.



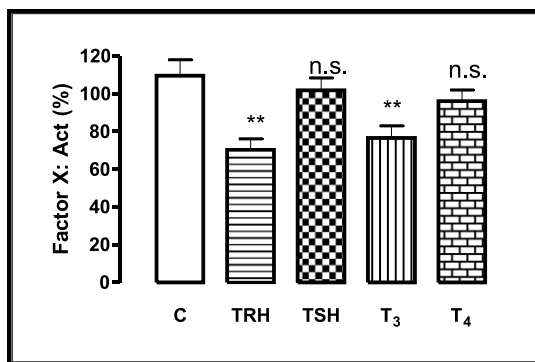
Фиг. 17. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно, в три последователни дни върху активността на плазмен фактор VII (Factor VII: Act). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *** - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.



Фиг. 18. Активност на плазмен фактор IX (Factor IX: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.



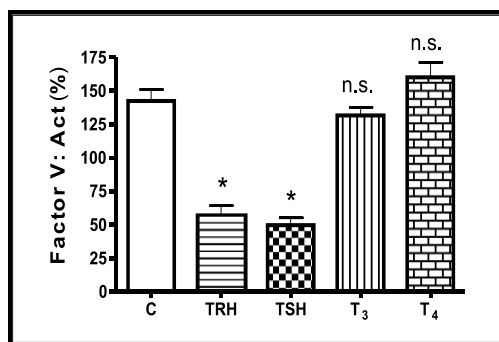
Фиг. 19. Промени в активността на плазмен фактор X (Factor X: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.01$; n.s. – без значимост.

Добре известно е, че съществуват много общи страни в характеристиката на плазмените фактори на хемокоагулация - II, VII, IX и X, а именно: място на образуване и зависимост от витамин К (S. E. Lind et al., 1999; G. A. Miggiano, L. Robilotta, 2005), участие във вътрешната и външна системи за образуване на протромбинов комплекс (S. Gallistl et al., 2002; R. W. Colman et al., 2006; M. H. Vos, R. M. Samire, 2010) и много други. Това наложи да се проучи паралелно зависимостта, от една страна - на синтезата и секрецията, и от друга – на активността на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирването от хормоните на тироидната ос. Значимо намаляване на антигенна концентрация и активност на всички коагулационни фактори от тази група (II, VII, IX и X) се установява под влияние на два от хормоните на тироидната ос – TRH и T₃ (Фигури 12-19). T₄ също силно редуцира тези показатели, но само по отношение на F II. Специфично е влиянието и на TSH. Този хормон супресира значимо синтезата и секрецията от хепатоцитите на факторите II, VII, IX и X, но не повлиява тяхната активност.

Като се има предвид, че изследваните фактори на коагулацията, са елементи на вътрешната и външна системи за образуване на протромбинов активатор (R. W. Colman et al., 2006; M. H. Bos, R. M. Camire, 2010) може да се приеме, че наблюдаваните промени в тях имат отношение към развитието на установения вече хипокоагулабилитет. Допуска се също, че установените различия в ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ са доказателство, че тези хормони имат самостоятелни ефекти върху витамин К-зависимите фактори на коагулацията.

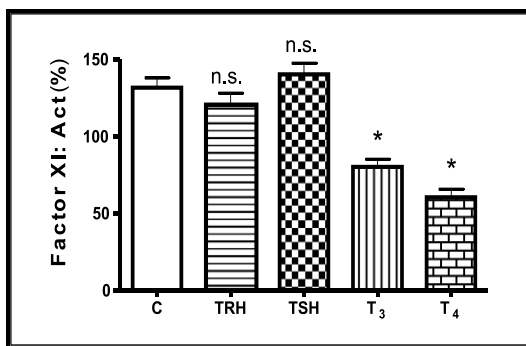
Чрез втората експериментална постановка се проучи влиянието на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху две групи фактори на кръвосъсирването - факторите V, XI, XII и XIII и факторите VIII и von Willebrand. Две съображения наложиха обособяването на тези експериментални групи: първо – особеното място, което заемат в коагулацията и второ - съществуването на специфична връзка между тях. Всичко това предстои да бъде изяснено.

Ефектите на тироидната хормонална ос върху активността на плазмените коагулационни фактори V, XI, XII и XIII са представени на фигури 20-23.

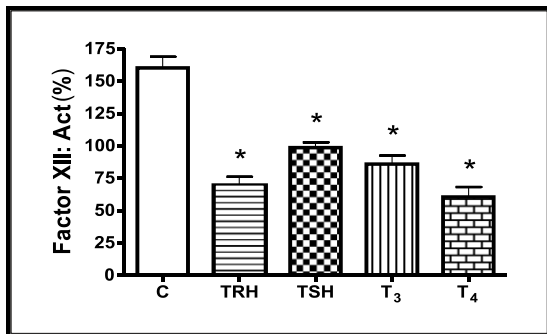


Фиг. 20. Промени в активността на плазмен фактор V (Factor V: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

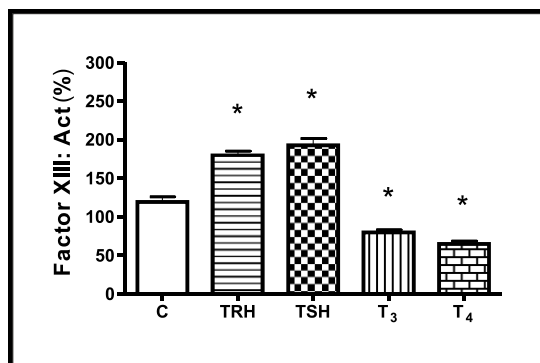
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.



Фиг. 21. Промени в активността на плазмен фактор IX (Factor IX: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm Sx$, * - $p < 0.001$; p.s. – без значимост.



Фиг. 22. Плазмено ниво на активност на фактор XII (Factor XII: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm Sx$, * - $p < 0.001$.



Фиг. 23. Плазмена активност на фактор XIII (Factor XIII: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

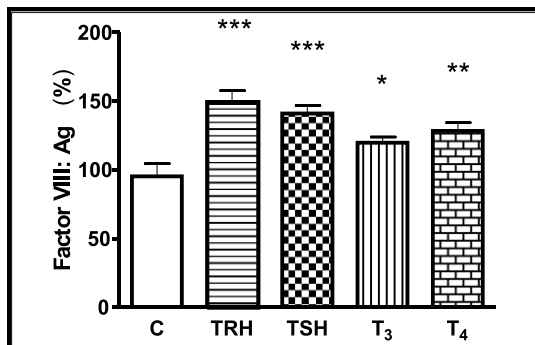
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Промените в плазмената концентрация и активност на фактор VIII и фактора на von Willebrand, под влияние на хормоните на тироидната ос, са показани на фигури 24 -28.

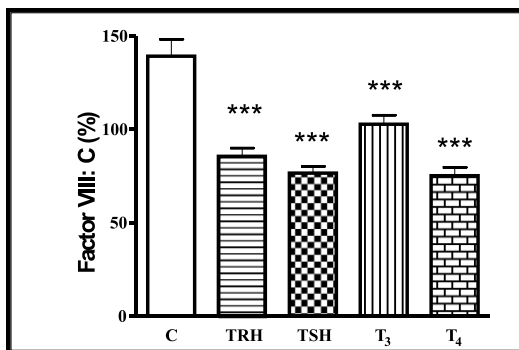
В групата плъхове третирани с TRH (Фигура 24) плазмената концентрация на Factor VIII: Ag беше повишена от 95.25 ± 9.29 в контролната група, до 150.00 ± 7.84 ($p < 0.001$) (Фигура 24), а при третираните с TSH – до 141.10 ± 5.74 ($p < 0.001$). T₃ и T₄ увеличиха този параметър в съответните групи до 119.80 ± 4.08 ($p < 0.05$) и 128.20 ± 6.19 ($p < 0.01$).

Коагулационната активност на Factor VIII: C (Фигура 25) беше намалена от TRH, TSH, T₃ и T₄ от 139.50 ± 8.97 (контролна група) до 85.52

± 4.61 ($p < 0.001$), 76.67 ± 3.59 ($p < 0.001$), 102.90 ± 4.78 ($p < 0.001$) и 75.34 ± 4.51 ($p < 0.001$).



Фиг. 24. Плазмена концентрация на Factor VIII: Ag (фактор VIII, антиген) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.01$; * - $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$.

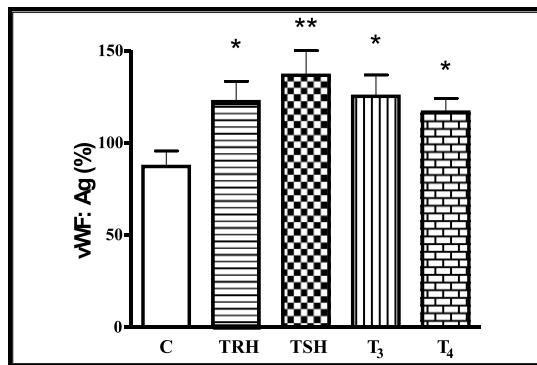


Фиг. 25. Плазмена коагулационна активност на Factor VIII: C (фактор VIII, коагулационна активност) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с

физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *** - $p < 0.001$.

Плазмената концентрация на vWF: Ag беше увеличена (Фигура 26): при TRH – третираните плъхове – до 121.80 ± 11.57 ($p < 0.05$), при третираните с TSH – до 136.60 ± 13.42 ($p < 0.01$), а при третираните с T_3 и T_4 – съответно до 125.20 ± 11.55 ($p < 0.05$) и 116.50 ± 7.56 ($p < 0.05$). Средната стойност на контролната група животни беше 87.16 ± 8.40 .

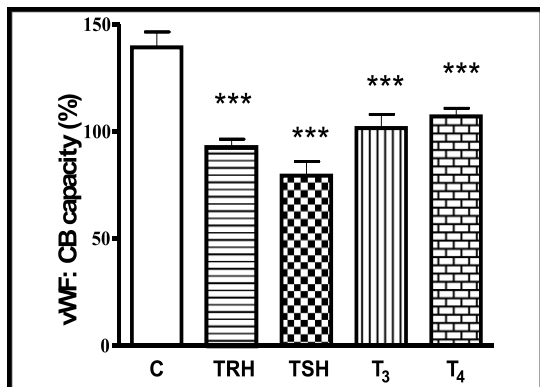


Фиг. 26. Плазмена концентрация на vWF: Ag (фактор на фон Вилебранд, антиген) у мъжки плъхове Wistar, третиран с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$.

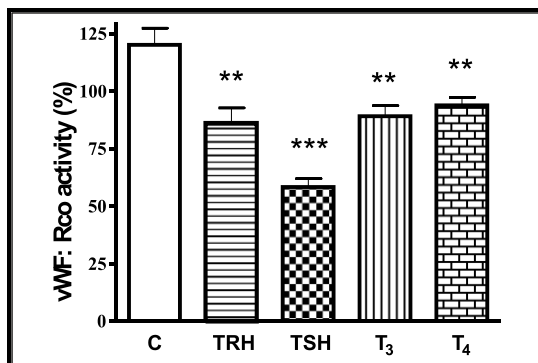
При определяне на колаген-свързващия капацитет на фактора на фон Вилебранд (vWF: CB) (Фигура 27) се установи, че хормоните на тироидната от предизвикват неговата редукция: TRH – до 92.58 ± 4.00 ($p < 0.001$), TSH –

до 79.61 ± 6.50 ($p < 0.001$), T_3 – до 101.70 ± 6.33 ($p < 0.001$), и T_4 – до 107.10 ± 3.79 ($p < 0.001$), при стойност на контролната група 139.40 ± 7.12 .



Фиг. 27. *Динамика на vWF: CB капацитет (колаген-свързващ капацитет на фактора на фон Вилебранд) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.*

*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *** - $p < 0.001$.*



Фиг. 28. *vWF: Rco активност (ристоцетин кофакторна активност на фактора на фон Вилебранд) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с*

TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$.*

От фигура 28 е видно, че vWF: Rco активност (ристоцетин кофакторна активност на фактора на фон Вилебранд) е понижена, под влияние на TRH – до 86.03 ± 6.78 ($p < 0.01$), на TSH – до 58.31 ± 3.68 ($p < 0.001$), на T₃ – до 89.14 ± 4.63 ($p < 0.01$) и на T₄ – до 93.89 ± 3.44 ($p < 0.01$). Стойността на контролната група беше 120.20 ± 7.10 .

Представените резултати показват, че TRH и TSH значимо ($p < 0.001$) потискат активността на F V и F XII (Фигури 20 и 22) и силно ($p < 0.001$) повишават активността на F XIII (Фигура 23). Известно е, че активираната форма на фактор V е кофактор на протромбиновия комплекс (X. Du, 2007), а плазмения фактор XII има иницираща роля за включване на вътрешния път за образуване на този комплекс (R. W. Colman et al., 2006). Това дава основание да се приеме, че приложението на TRH и TSH потиска формирането на протромбиновия комплекс, който както е известно, превръща протромбина в тромбин. Считаме, че нарушената конверсия на протромбина е един от механизмите, чрез които TRH и TSH предизвикват установената вече тенденция към хипокоагулABILитет (Задача 1). TRH и TSH повишават активността на фибрин-стабилизиращия фактор (XIII плазмен фактор) (Фигура 23), което най-вероятно е опит на регулаторната система на хемостазата да се противопостави на възникналия хипокоагулABILитет.

От резултатите свързани с T₃ и T₄ прави впечатление, че тези хормони имат еднопосочен с TRH и TSH ефект само по отношение на F XII, потискайки неговата активност (Фигура 22). По отношение на плазмен F V

те нямат ефект (Фигура 20), а спрямо F XI и F XIII (Фигури 21 и 23) най-общо може да се каже, че той е противоположен на TRH и TSH. От това следва, че ефектите на TRH, TSH са еднопосочни и независими от ефектите на T_3 и T_4 спрямо F V, F XI и F XIII.

Особено внимание заслужават промените наблюдавани по отношение на плазмен F VIII – антиген и активност. Плазмената концентрация на F VIII: Ag (Фигура 24) беше значимо повишена от всички хормони на тироидната ос, а коагулационната активност на същия фактор (F VIII: C) беше силно редуцирана (Фигура 25). Налице е дисоциация между концентрация и активност, за която може да се приеме, че е доказателство за специфичните ефекти на използваните хормони. Видно е, че TRH, TSH, T_3 и T_4 , от една страна стимулират процесите на синтез и секреция на този фактор от хепатоцитите и от друга – водят до намаляване на неговата активност.

Известно е, че фактор VIII изпълнява много функции (S. Butenas et al., 2009; M. H. Bos, R. M. Camire, 2010). За настоящето проучване особен интерес представляват две от неговите функции. Първа - ролята на кофактор при активирането на F X от активирания F IX (Q. Shi et al., 2008), позволява да се приеме, че установената в случая намалена коагулационна активност на този фактор кореспондира с установения от нас хипокоагулабилитет. Втората функция е резултат от протеолитичните трансформации, които претърпява молекулата на F VIII - превръщайки се в структура, която циркулира в кръвта като устойчив комплекс с фактора на von Willebrand (H. Yarovoi et al., 2005).

Подобни промени, свързани с дисоциация между концентрация (антиген) и активност, се наблюдават и при фактора на von Willebrand. Плазмената концентрация на vWF: Ag е повишена значимо от всички

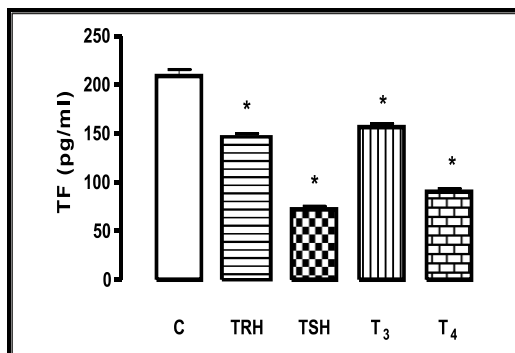
използвани хормони (Фигура 26), докато активността на фактора на von Willebrand, определена като колаген-свързващ капацитет (vWF: CB капацитет) (Фигура 27) и като ристоцетин кофакторна активност на фактора на von Willebrand (vWF: Rco) (Фигура 28) е силно понижена от TRH, TSH, T₃ и T₄. Тези резултати по аналогия на резултатите за F VIII показват, че хормоните на тироидната ос проявяват широк спектър на биологична активност, която е разнопосочна и по отношение на фактора на von Willebrand. Този фактор се синтезира в ендотелните клетки и мегакариоцитите, поради което се съдържа в α -гранулите на тромбоцитите (R. Nachman et al., 1977). Представлява гликопротеин, който има критична роля за функциите на тромбоцитите, за тяхната адхезия, за осъществяването на първичната хемостаза (L. Bernard et al., 2007). Приемаме, че намалената активност на фактора на von Willebrand, под влияние на TRH, TSH, T₃ и T₄, най-вероятно има определящо значение за значимо потиснатата функционална активност на тромбоцитите, показана на фигури 10 и 11 (Задача 2 б).

С третата експериментална постановка беше проучено влиянието на тироидната хормонална ос върху две групи фактори на хемокоагулацията: едната – тъканен фактор (TF), наречен още плазмен фактор III (F III) или тромбопластин и инхибитора на пътя на тъканния фактор (TFPI), и втората – фибринопептид А и протромбинови фрагменти F₁₊₂.

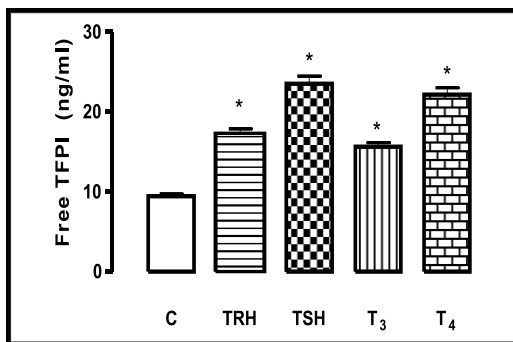
Ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху плазменото ниво на TF и TFPI са показани на фигури 29-31.

Нивото на тъканния фактор (TF) (Фигура 29) беше понижено от TRH до 148.30 ± 1.85 ($p < 0.001$), от TSH – до 72.34 ± 3.30 ($p < 0.001$), от T₃ – до

156.60 ± 3.63 ($p < 0.001$) и от T₄ – до 90.63 ± 3.05 ($p < 0.001$), при стойност на контролната група 209.20 ± 6.58.



Фиг. 29. Плазмена концентрация на TF (тъканен фактор) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm \bar{S}_x$, * - $p < 0.001$.



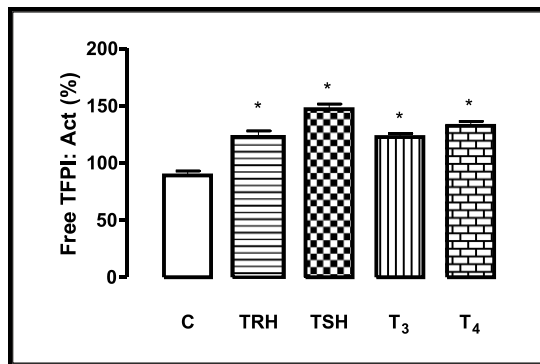
Фиг. 30. Промени в плазмената концентрация на свободния TFPI (инхибитор на пътя на тъканния фактор) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.)

и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Ефектите на тироидната хормонална ос върху концентрацията на свободния TFPI в плазмата са показани на фигура 30. TRH повишава концентрацията на този показател на хемокоагулацията до 17.34 ± 0.53 ($p < 0.001$), TSH – до 23.55 ± 0.94 ($p < 0.001$), T₃ – до 15.61 ± 0.50 ($p < 0.001$) и T₄ – до 22.16 ± 0.84 ($p < 0.001$), изчислени спрямо стойността на контролната група (9.47 ± 0.25).

Активността на свободния TFPI (Фигура 31) беше повишена както следва: от TRH – до 123.10 ± 5.02 ($p < 0.001$), от TSH – до 147.20 ± 4.44 ($p < 0.001$), от T₃ – до 122.60 ± 3.32 ($p < 0.001$) и от T₄ – до 132.50 ± 4.13 ($p < 0.001$), изчислени спрямо стойността на контролната група 89.22 ± 3.99 .



Фиг. 31. Динамика на свободния TFPI: Act (активност на свободния инхибитор на пътя на тъканния фактор) у мъжки плъхове Wistar, третиран с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

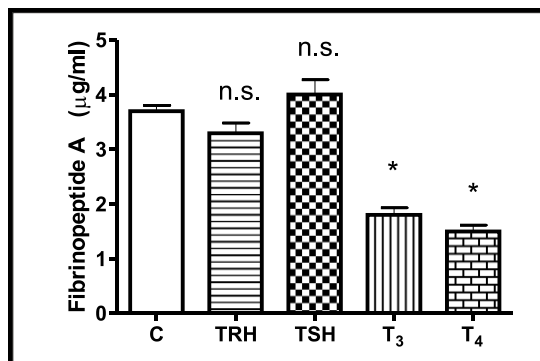
*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*

Отдавна е установено, че TF е ключов ензим за активиране на хемокоагулацията по външната система за образуване на протромбинов активатор. TF се свързва с активиран F VII и образува комплекс, който на свой ред активира F X (Y. Nemerson, 1988; T. S. Edgington et al., 1991). Ролята на специфичен физиологичен инактиватор на комплекса TF/VIIa изпълнява TFPI (M. S. Bajaj et al., 2001; P. Golino, 2002; P. Golino et al., 2003; U. Hedner et al., 2008). В светлината на тези литературни данни, нашите резултати получават пълно обяснение. Използваните хормони, TRH, TSH, T₃ и T₄ понижават значимо плазмената концентрация на TF (Фигура 29), докато концентрацията и активността на неговия инхибитор (TFPI) са силно повишени ($p < 0.001$) (Фигури 30 и 31). Ако се изходи от механизма на действие на TFPI, може да се приеме, че повишената активност на TFPI е най-вероятната причина за понижението на TF (M. S. Bajaj et al., 2001; P. Golino et al., 2003; U. Hedner et al., 2008).

Като резултат от това, би следвало да се очаква, че под влияние на хормоните на тироидната ос активността на X плазмен фактор е понижена. В действителност, при съпоставяне на тези резултати, с представените вече на фигура 19, е видно, че достоверно понижение на активността на този фактор се наблюдава само под влияние на TRH и T₃, а TSH и T₄ предизвикват незначително понижение. Считаме, че това противоречие ще получи задоволително обяснение при анализа на резултатите като цяло.

Представените на фигура 29 резултати позволяват да се отбележи и факта, че T₄ има по-силно изразен ефект върху TF от T₃, а TSH проявява най-силно изразен ефект. Може да се предположи, че TSH и T₄ осъществяват своя редуциращ ефект върху нивото на TF не само като елементи на тироидната ос, но и директно.

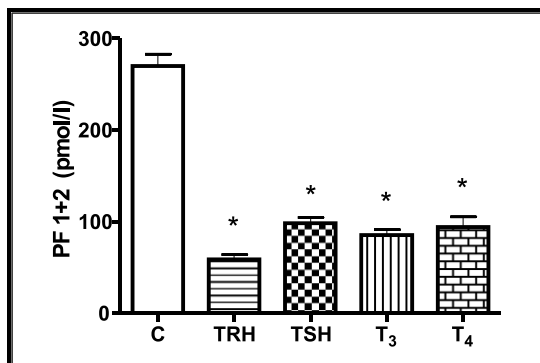
За пълнота, в края на тази задача, беше проучено влиянието на хормоните на тироидната ос върху ранните маркери на коагулационния статус, а именно: фибринопептид А и протромбинови фрагменти F 1+2.



Фиг. 32. Динамика в плазмената концентрация на фибринопептид А у мъжки плъхове Wistar, третираны s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.

Плазмената концентрация на фибринопептид А (Фигура 32) беше понижена при плъховете третираны T₃ и T₄ от $3.70 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ при контролните животни до, съответно $1.81 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) и $1.50 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$). Този показател не беше повлиян значимо от TRH и TSH.

От фигура 33 е видно, че PF 1+2 (протромбинови фрагменти F 1+2) са значимо понижени ($p < 0.001$) след прилагане на всички хормони както следва: от TRH – до $59.15 \pm 4.89 \text{ pmol/l}$, от TSH – до $98.54 \pm 6.41 \text{ pmol/l}$, от T₃ – до $85.69 \pm 6.02 \text{ pmol/l}$ и T₄ – до $94.31 \pm 11.10 \text{ pmol/l}$, при стойност на контролната група $270.10 \pm 12.97 \text{ pmol/l}$.



Фиг. 33. Плазмено ниво на PF 1+2 (протромбинови фрагменти F 1+2) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

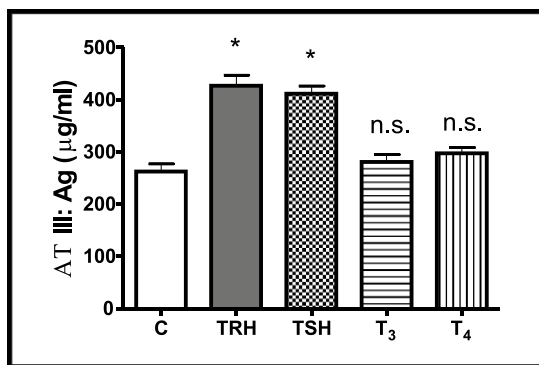
Литературните данни показват, че фибринопептид А и PF 1+2 се използват все по-често в клиничната практика за установяване ранни нарушения в хемостазния профил (J. P. Herault et al., 1997; P. C. Y. Liaw et al., 2004; H. S. Kwon et al., 2008). Повишеното ниво на фибринопептид А говори за увеличено образуване на фибрин, а нарастване на плазмената концентрация на PF 1+2 - за увеличено образуване на тромбин. Тези промени се приемат като сигурен критерий за развитие на хиперкоагулABILитет. При хипокоагулABILитет плазмените концентрации на фибринопептид А и PF 1+2 са намалени (P. R. Eisenberg et al., 1993; C. S. Vieira et al., 2007; B. Lars et al., 2011).

От това следва, че показаната по-горе значимо понижена концентрация на фибринопептид А при животните третирани с T₃ и T₄ (Фигура 32) и на PF 1+2 след третиране на животните с всички хормони на тироидната ос (Фигура 33) са потвърждение на установената тенденция към хипокоагулABILитет.

4. ЕФЕКТИ НА ХОРМОНИТЕ НА ТИРОИДНАТА ОС ВЪРХУ АНТИКОАГУЛАЦИОННАТА СИСТЕМА НА ХЕМОСТАЗАТА

На фигури 34 - 37 са показани резултатите от ефектите на хормоните на тироидната ос върху антитромбин III, тромбин-антитромбин комплекс и тромбомодулин.

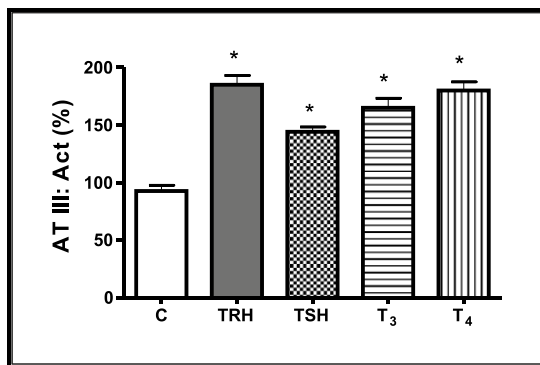
TRH и TSH, представени на фигура 34, повишиха значимо концентрацията на антитромбин III ($p < 0.001$) от $262.80 \pm 14.52 \mu\text{g/ml}$ при контролните животни до, съответно $426.80 \pm 20.11 \mu\text{g/ml}$ и $411.30 \pm 15.23 \mu\text{g/ml}$. T_3 и T_4 не повлияха значимо този показател.



Фиг. 34. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху концентрацията на AT III: Ag (антитромбин III, антиген). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

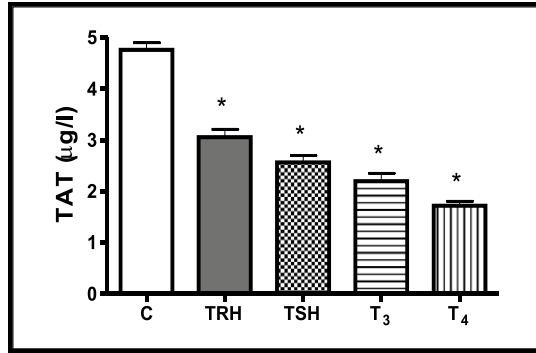
Данните са представени като $\bar{x} \pm 5\bar{x}$, * - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.

Активността на антитромбин III в % (Фигура 35) беше повишена от всички хормони на тиоридната ос ($p < 0.001$) от 92.93 ± 5.02 при контролната група, до 185.20 ± 7.91 , 144.20 ± 4.22 , 165.20 ± 8.28 и 180.3 ± 7.37 , съответно за третираните с TRH, TSH, T_3 и T_4 .



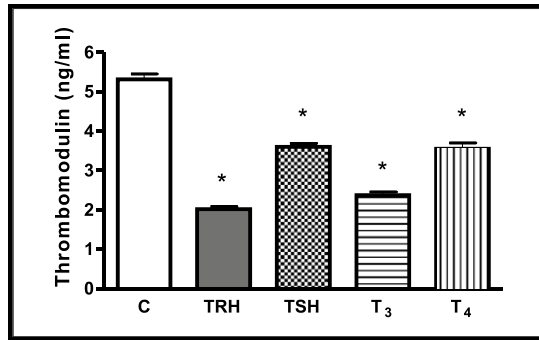
Фиг. 35. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху AT III: Act (антитромбин III, активност). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Концентрацията на комплекса тромбин-антитромбин в плазмата, представена в $\mu\text{g/l}$, (Фигура 36) беше понижена и от четирите хормона ($p < 0.001$ за всички групи), съответно от 4.76 ± 0.15 при контролната група, до 3.08 ± 0.15 , 2.57 ± 0.13 , 2.20 ± 0.15 и 1.72 ± 0.09 при групите третираните с TRH, TSH, T_3 и T_4 .



Фиг. 36. Динамика на плазменото ниво на TAT (тромбин-антиромбин) комплекс у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.



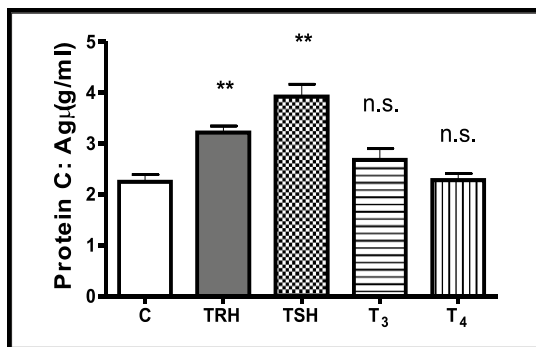
Фиг. 37. Плазмена концентрация на Thrombomodulin (тромбомодулин) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

TRH, TSH, T₃ и T₄ понижиха значимо концентрацията на разтворимата форма на тромбомодулина, представена в ng/ml, от 5.31 ±0.14 при контролната група, до съответно 2.02 ±0.06, 3.60 ±0.09, 2.37 ±0.08 и 3.55 ±0.14. (Фигура 37).

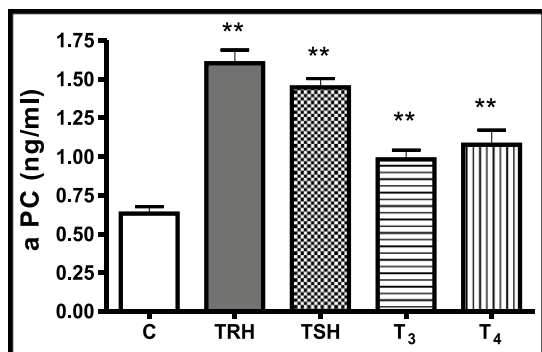
Ефектите на хормоните на тироидната ос върху протеин С-антикоагулантния път са представени на фигури 38- 44.

Концентрацията на протеин С (PC:Ag) (Фигура 38) в това проучване беше значимо повишена ($p < 0.001$) след приложението на TRH и TSH от 2.25 ±0.14 µg/ml при контролната група, до съответно 3.22 ±0.12 µg/ml и 3.92 ±0.24 µg/ml. T₃ и T₄ не повлияха съществено този показател.



Фиг. 38. Концентрация на Protein C: Ag (протеин С, антиген) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

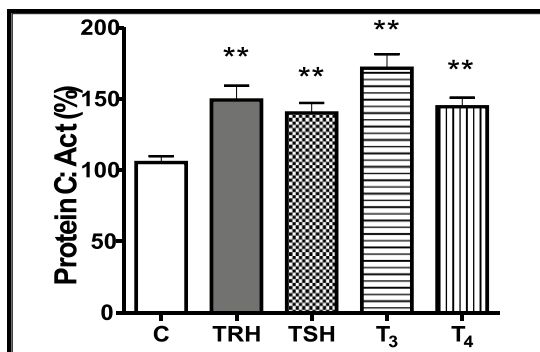
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.001$; n.s. – без значимост.



Фиг. 39. Динамика на плазменото ниво на аРС (активиран протеин С) у мъжки плъхове Wistar, третирани *s.c.* с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** - $p < 0.001$.

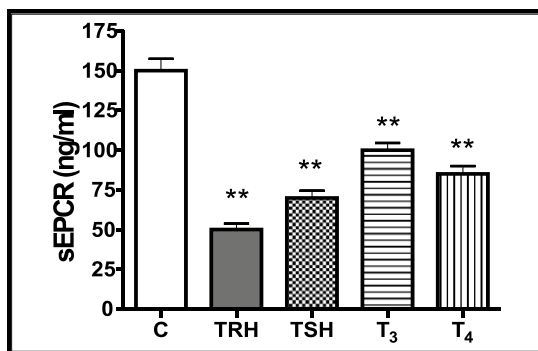
Концентрацията на активираният протеин С, изразена в ng/ml, (Фигура 39) беше повишена под влияние на всички хормони, както следва: от 0.63 ± 0.04 при контролната група, до 1.60 ± 0.08 ; 1.45 ± 0.05 ; 0.98 ± 0.06 и 1.08 ± 0.09 – третирани съответно с TRH, TSH, T₃ и T₄.

Активността на протеин С (%) (Фигура 40) беше увеличена значимо от TRH, TSH, T₃ и T₄ от 105.30 ± 4.51 при контролните животни, до, съответно: 149.20 ± 10.11 ; 140.20 ± 7.07 ; 171.60 ± 9.79 и 144.60 ± 6.28 .



Фиг. 40. Плазмена Protein C: Act (активност) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

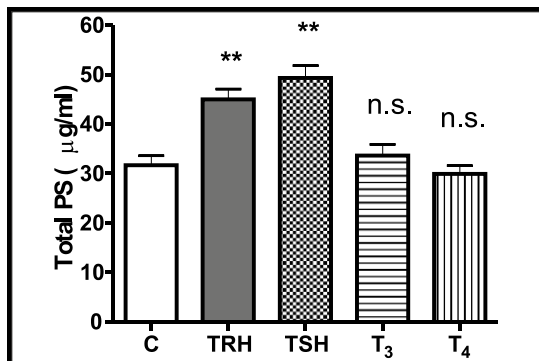
Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** $p < 0.001$.



Фиг. 41. Промени в плазмената концентрация на sEPCR (разтворима форма на ендотелен протеин C рецептор) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, ** $p < 0.001$.

Разтворимата форма на ендотелния протеин С рецептор (sEPCR) (Фигура 41) беше понижена от TRH, TSH, T₃ и T₄ от 149.90 ±7.48 ng/ml при контролите, до, съответно: 50.10 ±3.68; 69.96 ±4.48; 100.00 ±4.49 и 85.04 ±4.99.



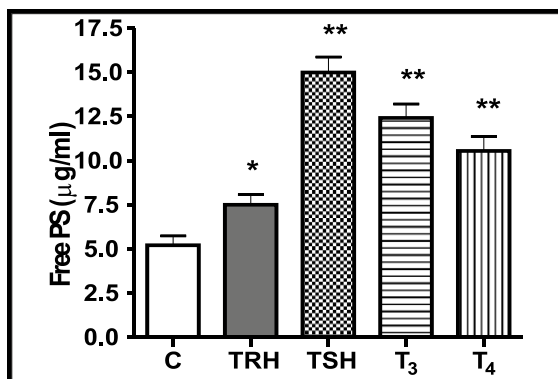
Фиг. 42. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху общия PS (общ протеин S). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, **-. $p < 0.001$; n.s. – без значимост.

Общият протеин S беше повишен от TRH и TSH (Фигура 42) както следва: 45.04 ± 2.10 µg/ml ($p < 0.001$) и 49.37 ± 2.52 µg/ml ($p < 0.001$), при стойности на контролната група 31.70 ± 1.93 µg/ml. Този показател не беше повлиян съществено от T₃ и T₄.

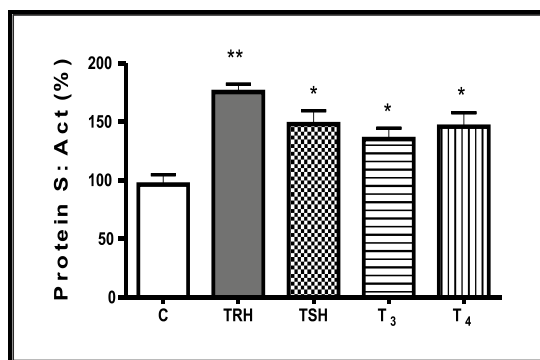
Свободният протеин S (Фигура 43) беше повишен при всички групи плъхове инжектирани както следва: с TRH до 7.49 ± 0.58 µg/ml ($p < 0.01$), с TSH до 14.98 ± 0.88 µg/ml ($p < 0.001$), с T₃ до 12.41 ± 0.78 µg/ml ($p < 0.001$) и

T₄ до 10.55 ±0.80 µg/ml (p<0.001), при стойност на контролната група 5.21 ±0.53 µg/ml.



Фиг. 43. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху свободния PS (свободен протеин S). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - p<0.01; ** - p<0.001.

Активността на протеин S (%) също беше повишена от всички хормони (Фигура 44) от 96.40 ±8.38 при контролните плъхове, до 175.30 ±6.72 (p<0.001) под влияние на TRH до 147.90 ±11.46 (p<0.01) при третиране с TSH, а при третиране с T₃ и T₄ съответно до 135.30 ±9.12 (p<0.01) и 145.80 ±11.91 (p<0.01).



Фиг. 44. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху Protein S: Act (протеин S, активност). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.01$; ** - $p < 0.001$.

Един от основните ефекти на антикоагулантната система е насочен към инактивиране на плазмен фактор IIa (тромбин). Известно е, че получаването на тромбин е ключова стъпка в хемокоагулацията (К. Tanaka et al., 2009). От една страна, тромбинът е основен ензим повлияващ образуването на фибрин, активирането на плазмените фактори на кръвосъсирването V, VII, VIII, IX, и фибрин-стабилизиращия фактор (фактор XIII), както и стимулирането на адхезията и агрегацията на тромбоцитите. От друга страна, сериновата протеаза тромбин активира елементи на две други системи, които противостоят на активираната хемостаза, а именно активира протвосъсирващата система по пътя на протеин С и на фибринолизата – по пътя на активиране на TAFI (H. V. Jakubowski, W. G. Owen et al., 1989; S. Narayanan, 1999).

Един от основните пътища на антикоагулацията е инактивирането на тромбина от неговия основен инхибитор антитромбин III.

В това проучване концентрацията на антиромбин III в плазмата беше повишено ($p < 0.001$) от TRH и TSH (Фигура 34), но не се повлия значимо от T_3 и T_4 . Увеличените нива на антиромбин III могат да се интерпретират като увеличена биосинтеза, намален клирънс или консумация. Липсата на значими ефекти на T_3 и T_4 върху концентрацията на антиромбин III в плазмата може да се приеме като доказателство за това, че TRH и TSH повишават синтезата на антиромбин III без медиацията на T_3 и T_4 , т.е. те осъществяват автономни ефекти. Тази хипотеза е логична и се подкрепя от данни за директни ефекти на TSH при адипоцити, остеобласти и хепатоцити и експресията на TSH рецептори при чернодробните клетки (P. Yen, 2001; L. Tian et al., 2010).

Плазмената активност на АТ III беше увеличена значимо (Фигура 35) и от четирите хормона. От това следва, че хормоните на тироидната ос са важен регулатор на активността на АТ III, като я повишават.

Промените в разглежданите показатели, сочещи стимулиращи ефекти на хормоните на тироидната ос върху антиромбин III, предполагат активиране на антикоагулантната система чрез инхибиране на тромбина и тенденция към хипокоагулацията.

Инхибирането на тромбина се осъществява след образуване на комплекс тромбин-антиромбин III. Концентрацията на комплекса тромбин-антиромбин III в плазмата беше понижена и от четирите хормона включени в проучването (Фигура 36). В клиничната практика повишението на този показател се счита за свидетелство за активен тромботичен синдром и се приема като ранен маркер за претромботични и хиперкоагулационни състояния (J. Montaner, 2009). Това позволява да се приеме, че установеното в случая намалено ниво на комплекса ТАТ и повишена активност на АТ III (Фигура 35) са в хармония помежду си и имат своя значим принос в развитието на хипокоагулация.

Разтворимата форма на тромбомодулина в плазмата (Фигура 37) беше значимо понижена от TRH, TSH, T₃ и T₄. Тромбомодулинът се синтезира главно в ендотелните клетки и притежава мултифункционална природа. От една страна, той образува една вътрешна антикоагулантна бариера – между кръвта и ендотела. От друга страна, той функционира като клетъчен повърхностен рецептор на активния тромбин. След свързване на тромбомодулина с тромбина, последният губи коагулантната си активност, но запазва способността си да активира протеин С-антикоагулантния път и да инхибира фибринолизата (активира тромбин-активируемия инхибитор на фибринолизата – TAFI) (S. T. Esmon, 2003; H. Weiler 2004; C. Esmon, 2005; B. Dahlbäck, B. O. Villoutreix, 2005). Ролята на тромбомодулина все още не е напълно прецизирана (Y. H. Li et al., 2009). Повечето автори считат, че повишеното ниво на разтворимия тромбомодулин е израз на ендотелна дисфункция (заедно с vWF) и говори за хиперкоагулация, а пониженото ниво – за хипокоагулация (S. Kodama et al., 1990; M. Seigneur et al., 1993; J. P. Grnager et al., 2001; L. Poston, 2006). Съществуват клинични данни за връзка между тироидния статус и серумния тромбомодулин при пациенти с тиротоксикоза, доказващи ролята на тромбомодулина като възможен нов маркер за периферната активност на тироидните хормони (Y. Morikawa et al., 1993). Нашите данни отнасящи се до този параметър, поне във връзка с ефектите на T₃ и T₄ противоречат на тези резултати. В тази връзка трябва да се има пред вид, че болестта на Graves се придружава от сериозни нарушения на метаболизма, на функциите на редица органи и системи, включително модифициране на мембранните рецептори и имунитета (A. Squizzato et al., 2007).

Разгледаните резултати сочат, че TRH, TSH, T₃ и T₄ са ангажирани в регулацията на антикоагулантната система при плъхове чрез увеличаване

на активността на антитромбин III, редукция на плазменото ниво на комплекса тромбин-антитромбин III и тромбомодулин.

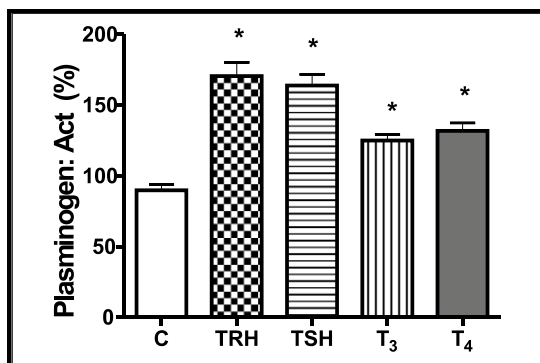
Подобна тенденция на хипокоагулабилитет показват резултатите от изследването на ефектите на хормоните на тироидната ос върху протеин С-антикоагулнатния път, представляващ една многокомпонентна система. Концентрацията на протеин С беше повишена от TRH и TSH и не бяха установени значими промени при групите третирани с T_3 и T_4 (Фигура 38). Това би могло да е индикация за стимулиране на синтеза на протеин С:Ag от TRH и TSH самостоятелно без участието на T_3 и T_4 . Концентрацията на активирания протеин С (Фигура 39), както и активността на този показател (Фигура 40) бяха значимо повишени от четирите хормона, което показва, че хормоните на тироидната ос повишават активността на антикоагулнатния път на протеин С. Както е известно, трансформирането на неактивния протеин С в активен, се осъществява от комплекса тромбин-тромбомодулин (B. Dahlbäck, 2005; F. J. Castellino, V. A. Ploplis, 2009). TRH, TSH, T_3 и T_4 понижиха значимо концентрацията на разтворимия ендотелен рецептор за протеин С (sEPCR), показател, за който се счита, че инактивира антикоагултантната активност на активирания протеин С. Намаленото ниво в плазмата на sEPCR хармонизира с увеличената активация на протеин С.

Антикоагултантната активност на протеин С в последствие се осъществява след асоцииране с неговия кофактор протеин S, което се последва от протеолитично рарушаване на плазмени фактори Va и VIIIa и намалено образуване на тромбин (E. Castoldi, T. M. Hackeng, 2008; J. Rosing et al., 2008). Данните от проучването, показани на фигури 42-44 сочат, че хормоните на тироидната ос осъществяват допълнителен ефект към антикоагулнатния път на протеин С чрез повлияване на протеин S. TRH и TSH повишават общия протеин S, докато свободния протеин S и неговата активност се увеличават значимо и от четирите хормона. Прави впечатление, че TRH и TSH силно увеличават общия протеин S

независимо от T_3 и T_4 (Фигура 42), подобно на ефектите им върху протеин С: Ag (Фигура 38). Това предполага, че TRH и TSH са директно ангажирани в този антикоагулационен механизъм чрез стимулиране на биосинтезата както на протеин С, така и на протеин S. Значимото повишение на активността на протеин С (Фигура 40) и на неговия кофактор протеин S (Фигура 44) свидетелстват за съществено ангажиране на TRH, TSH, T_3 и T_4 в регулиране активността на антикоагулантния път на протеин С, като повишават неговата активност.

5. ВЛИЯНИЕ НА ТИРОИДНАТА ХОРМОНАЛНА ОС ВЪРХУ ПЛАЗМЕНОТО НИВО И АКТИВНОСТ НА ОСНОВНИТЕ МАРКЕРИ НА ФИБРИНОЛИТИЧНАТА СИСТЕМА НА ХЕМОСТАЗАТА

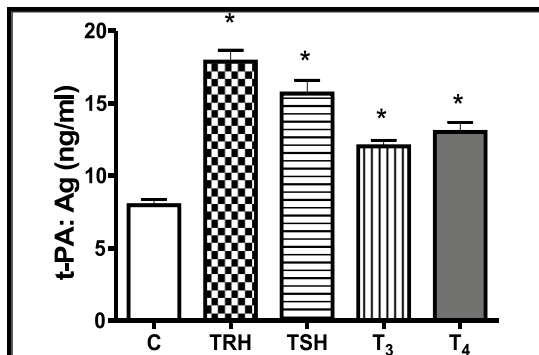
Активността на плазминогена, представена в %, (Фигура 45) беше повишена от 89.92 ± 4.23 при контролната група, до 170.70 ± 9.66 ($p < 0.001$); 164.10 ± 7.77 ($p < 0.001$); 125.20 ± 4.33 ($p < 0.001$) и 131.80 ± 5.81 ($p < 0.001$) при групите третиранни с TRH, TSH, T₃ и T₄.



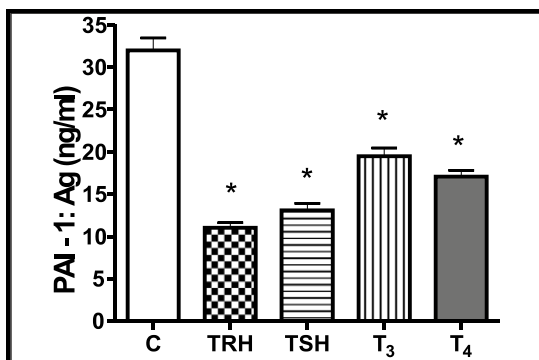
Фиг. 45. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху активността на плазминогена. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Концентрацията на тъканният активатор на плазминогена (t-PA: Ag), представена в ng/ml, (Фигура 46) беше повишена от всички приложени хормони – от 7.97 ± 0.42 в контролната група до 17.88 ± 0.78 ($p < 0.001$);

15.68 ±0.93 (p<0.001); 12.04 ±0.41 (p<0.001) 13.05 ±0.66 (p<0.001),
 съответно за TRH, TSH, T₃ и T₄.



Фиг. 46. Плазмена концентрация на t-PA: Ag (тъканен активатор на плазминогена, антиген) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - p<0.001.



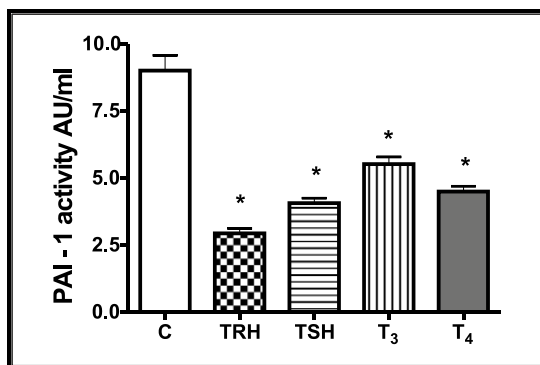
Фиг. 47. Влияние на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху

PAI-1: Ag (инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1, антиген). С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*

Във всички експериментални групи плазмената концентрация на инхибитора на плазминогеновия активатор – 1 (PAI-1), показана в ng/ml, беше снижена значимо ($p < 0.001$) от 32.00 ± 1.48 на контролната група, до, съответно: 11.05 ± 0.56 ; 13.12 ± 0.79 ; 19.50 ± 0.97 и 17.01 ± 0.76 (Фигура 47).

Плазмената активност на PAI-1, представена в AU/ml на фигура 48, беше редуцирана след приложение на TRH, TSH, T_3 и T_4 от 8.99 ± 0.57 на контролната група, до, съответно – 2.92 ± 0.19 ($p < 0.001$); 4.05 ± 0.18 ($p < 0.001$); 5.50 ± 0.27 ($p < 0.001$) и 4.47 ± 0.20 ($p < 0.001$).

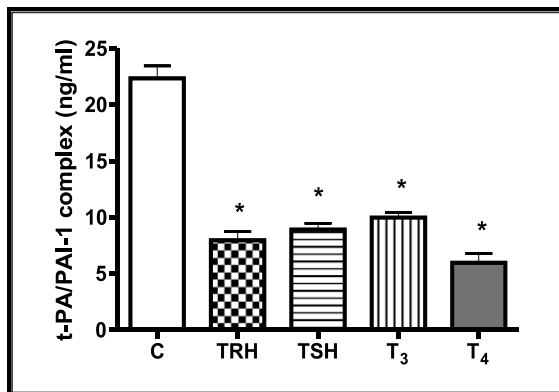


Фиг. 48. *Активност на PAI-1 (инхибитор на плазминогеновия активатор тип-1), в плазмата на мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.*

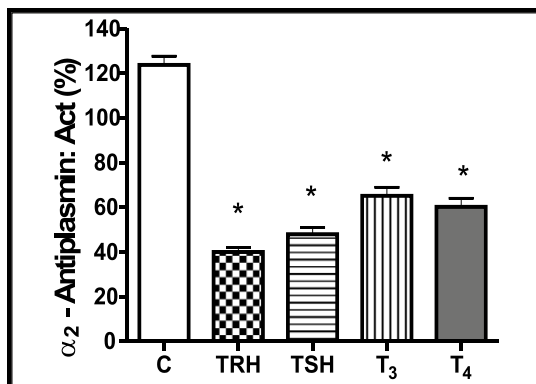
*Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.*

Комплексът t-PA/PAI-1, показан в ng/ml на фигура 49, беше значимо редуциран във всички експериментални групи ($p < 0.001$) от 22.36 ± 1.12 на

контролните животни, до -7.99 ± 0.76 ; 8.93 ± 0.55 ; 10.00 ± 0.46 и 5.99 ± 0.83 , съответно при групите третирани с TRH, TSH, T₃ и T₄.



Фиг. 49. Плазмена концентрация на комплекса *t*-PA/PAI-1 (тъканен активатор на пламиногена / инхибитор на пламиногеновия активатор *t*in-1) у мъжки плъхове Wistar, третирани *s.c.* с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

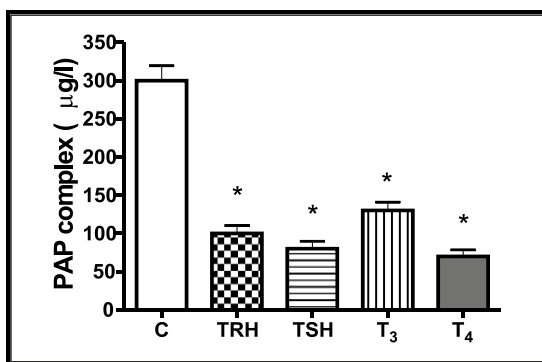


Фиг. 50. Активност на α_2 -антиплазмин в плазма на мъжки плъхове Wistar, третирани *s.c.* с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.)

един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- $p < 0.001$.

Активността на α_2 -антиплазмина, представена в %, (Фигура 50) беше силно понижена ($p < 0.001$) от TRH, TSH, T_3 и T_4 от 123.60 ± 3.91 (контролна група), до, съответно: 40.20 ± 1.95 ; 47.85 ± 3.00 ; 65.08 ± 3.85 и 63.45 ± 5.45 .



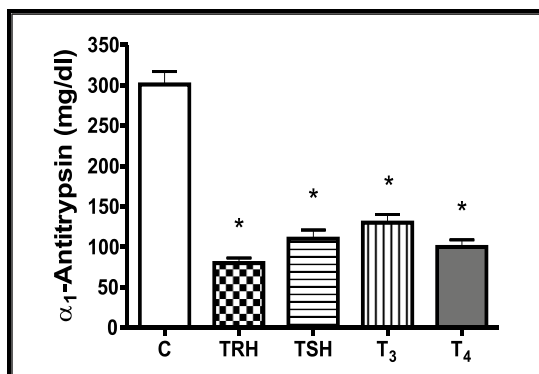
Фиг. 51. Промени в плазменото ниво на PAP (плазмин- α_2 -антиплазмин) комплекс у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- $p < 0.001$.

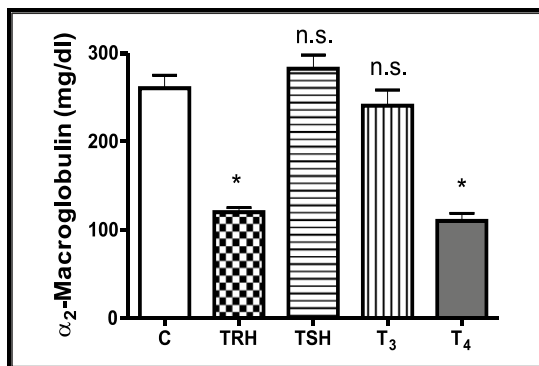
Комплексът плазмин- α_2 -антиплазмин (PAP), представен в $\mu\text{g/l}$, беше редуциран ($p < 0.001$) (Фигура 51) от 300.00 ± 19.37 на контролната група, до, респективно: 99.85 ± 10.44 ; 79.92 ± 9.83 ; 130.00 ± 10.99) и 70.00 ± 8.26 , при групите третирани с TRH, TSH, T_3 и T_4 .

TRH, TSH, T_3 и T_4 понижиха плазмената концентрация на α_1 -антитрипсин, представен в mg/dl , (Фигура 52) от 301.20 ± 16.09 на

контролната група, до, съответно: 80.00 ± 6.33 ($p < 0.001$), 110.20 ± 10.69 ($p < 0.001$), 130.0 ± 10.08 ($p < 0.001$) и 100.0 ± 8.57 ($p < 0.001$).



Фиг. 52. Промени в плазмената концентрация на α_1 -антитрипсин у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.



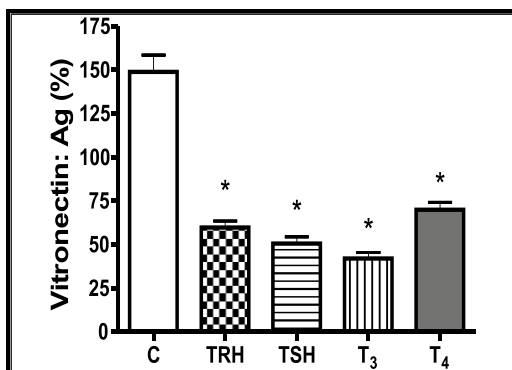
Фиг. 53. α_2 -макроглобулинова концентрация в плазмата на мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група,

инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- $p < 0.001$; n.s. – без значимост.

α_2 -макроглобулиновата концентрация в плазмата (Фигура 53), в mg/dl, беше понижена от TRH и T_4 от 260.00 ± 14.96 (контролна група), до, респективно: 119.80 ± 5.25 ($p < 0.001$) и 110.20 ± 8.52 ($p < 0.001$), но не беше повлияна от TSH и T_3 .

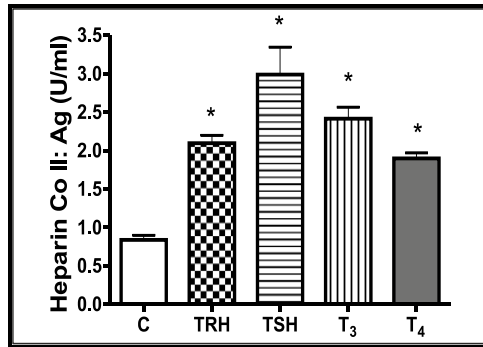
Витронектинът, представен в %, (Фигура 54) беше значимо понижен от всички използвани хормони ($p < 0.001$) от 149.00 ± 9.56 (контролна група), до: 59.92 ± 3.59 ; 50.46 ± 4.01 ; 42.08 ± 3.54 и 70.00 ± 4.24 , съответно в групите третирани с TRH, TSH, T_3 и T_4 .



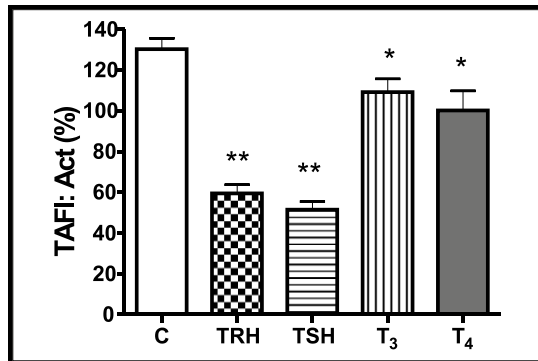
Фиг. 54. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху плазменото ниво на vitronectin: Ag (витронектин, антиген). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- $p < 0.001$.

Хепариновият кофактор II в плазмата, представен в U/ml, (Фигура 55) беше повишен ($p < 0.001$) при всички опитни групи, от 0.84 ± 0.06 (контролна група), до: 2.10 ± 0.10 ; 2.99 ± 0.36 ; 2.41 ± 0.15 и 1.89 ± 0.07 , респективно за TRH, TSH, T_3 и T_4 .



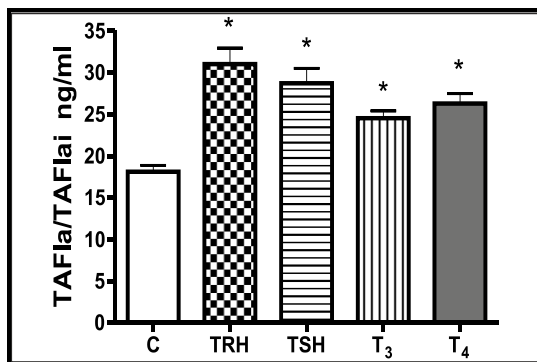
Фиг. 55. Динамика в концентрацията на Heparin Co II: Ag (хепарин кофакторо II, антиген) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.



Фиг. 56. Нива на TAFI: Act (тромбин-активируем инхибитор на фибринолизата, активност) в плазмата на мъжки плъхове Wistar, третирани s.c. с TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.) един път дневно в три последователни дни. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$.

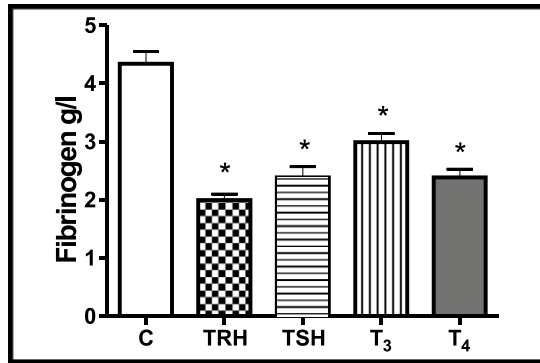
Активността (в проценти) на активируемия от тромбина инхибитор на фибринолизата (TAFI) беше понижена значимо ($p < 0.001$) от TRH и TSH, респективно, от 130.20 ± 5.44 на контролната група – до 59.45 ± 4.29 и 51.51 ± 3.98 . T_3 и T_4 понижиха активността на TAFI ($p < 0.05$), съответно до 109.10 ± 6.56 и 100.10 ± 9.63 (Фигура 56).

Ефектите на хормоните на тироидната ос върху концентрацията на TAFIa/TAFIai комплекса са представени в ng/ml на фигура 57. И четирите хормона TRH, TSH, T_3 и T_4 значимо увеличиха плазмената концентрация на показателя ($p < 0.001$) от 18.13 ± 0.77 при контролните животни, до, съответно: 31.01 ± 1.94 ; 28.71 ± 1.78 ; 24.54 ± 0.87 и 26.29 ± 1.21 .

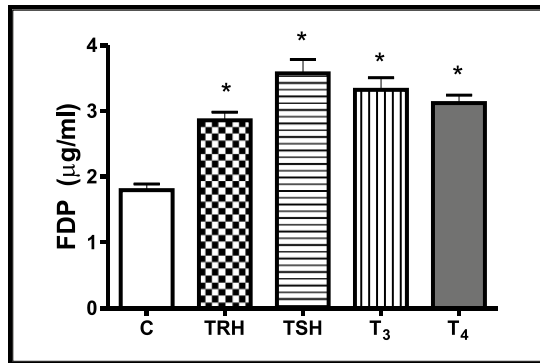


Фиг. 57. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху концентрацията на TAFIa/TAFIai (TAFIa (активиран) / TAFIai (инактивиран) комплекс, антиген). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, * - $p < 0.001$.

Плазмената концентрация на фибриногена в g/l, (Фигура 58) беше понижена при всички експериментални групи ($p < 0.001$) от 4.34 ± 0.21 (контролна група) до: 1.99 ± 0.11 ; 2.38 ± 0.18 ; 2.99 ± 0.15 и 2.38 ± 0.14 , съответно за TRH, TSH, T_3 и T_4 .



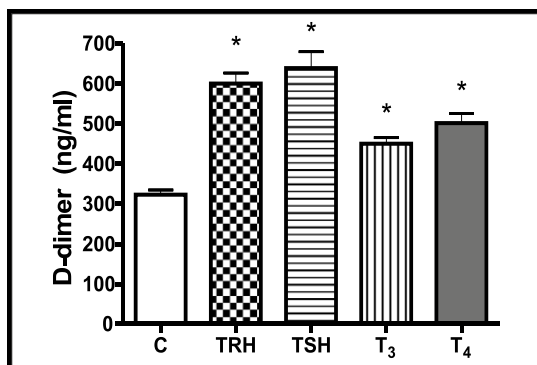
Фиг. 58. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху плазмената концентрация на фибриногена. C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- p<0.001.



Фиг. 59. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T₃ – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T₄ – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху плазменото ниво на FDP (фибрин-деградационни продукти). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S\bar{x}$, *- p<0.001.

Фибрин-деградационните продукти (FDP) (Фигура 59), показани в $\mu\text{g/ml}$, бяха повишени в групите третирани с TRH, TSH, T_3 и T_4 от 1.79 ± 0.09 (контролна група) до: 2.86 ± 0.12 ($p < 0.001$); 3.58 ± 0.21 ($p < 0.001$); 3.32 ± 0.18 ($p < 0.001$) и 3.12 ± 0.12 ($p < 0.001$), съответно за TRH, TSH, T_3 и T_4 .

Концентрацията на D-dimer, представена в ng/ml , (Фигура 60) беше повишена ($p < 0.001$) от TRH, TSH, T_3 и T_4 от 323.10 ± 12.13 (контролна група) до, съответно 600.40 ± 26.61 ; 638.90 ± 40.67 ; 450.10 ± 15.36 и 501.80 ± 23.67 .



Фиг. 60. Ефекти на TRH – тиротропин-освобождаващ хормон (0.06 mg/kg т.м.), TSH – тироид-стимулиращ хормон (1 IU/kg т.м.), T_3 – трийодтиронин (0.08 mg/kg т.м.) и T_4 – тироксин (0.08 mg/kg т.м.), приложени s.c. на мъжки плъхове Wistar, един път дневно в три последователни дни върху плазмената концентрация на D-dimer (Д-димер). С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. Данните са представени като $\bar{x} \pm S_x$, * - $p < 0.001$.

Фибринолитичната система е важен фактор участващ в подържането на прецизен баланс между коагулантната и антикоагулантна системи. В това проучване активността на инициращия елемент на фибринолитичната система – плазминогена, беше значимо повишена от всички хормони на тироидната ос (Фигура 45). Това е свидетелство за повишена

фибринолитична активност при плъхове след приложение на TRH, TSH, T_3 и T_4 , които водят до значимо нарастване на концентрацията на основния активатор на плазминогена – t-PA (тъканен тип активатор на плазминогена) (Фигура 46). Тези промени най-вероятно се дължат на анаболния ефект на тироидните хормони в черния дроб и други тъкани – явление описано в литературата при заболявания на щитовидната жлеза (M. J. Franchini, 2004). В този смисъл може да се допусне, че е налице еднопосочен ефект на хормоните на тироидната ос върху основните места на синтеза на плазминоген и t-PA – хепатоцитите и ендотелните клетки.

Важно значение има и факта, че инхибиторът на плазминогеновия активатор 1 (PAI-1) определян като концентрация (Фигура 47) и активност (Фигура 48) е значимо понижен от TRH, TSH, T_3 и T_4 . Това е знак за намалено инхибиране на фибринолитичната активност и е в подкрепа на повишеното ниво на t-PA. Към казаното дотук следва да се добавят и данните за циркулиращият комплекс t-PA /PAI-1, който е показател за активността на фибринолитичната система. Резултатите от проучването сочат, че TRH, TSH, T_3 и T_4 значимо понижават този параметър (Фигура 49), което подкрепя данните за повишена фибринолитична активност.

С казаното корелират и стойностите на основният инхибитор на фибринолизата – α_2 -антиплазмин, който беше със значимо понижена активност и в четирите опитни групи плъхове (Фигура 50). Тази промяна кореспондира с повишението на t-PA описано по-горе.

Данните сочат, че и двата основни инхибитора на фибринолизата са супресирани при всички експериментални групи. Комплексът плазмин/ α_2 -антиплазмин беше също понижен също от всички приложени хормони (Фигура 51). Намалените нива на този комплекс, по аналогия на казаното за комплекса t-PA/PAI-1, са в подкрепа на данните за повишена активност на фибринолитичната система.

Особен интерес представляват данните за α_1 -антитрипсин (Фигура 52), α_2 -макроглобулин (Фигура 53) и витронектин (Фигура 54). Те притежават широк спектър на биологична активност, в това число са известни и като инхибитори на фибринолизата (Н. Екмексі et al., 2002). Алфа1-антитрипсина и витронектина са значимо намалени ($p < 0.001$) под влияние на всички хормони на тироидната ос, което има своя принос за повишаване на активността на фибринолитичната система. Алфа2-макроглобулина е силно намален само под влияние на TRH и T_4 , което е доказателство, че техните ефекти са автономни, т.е. независими от останалите елементи на оста.

В този порядък следва да се разглеждат и резултатите, показващи влиянието на тироидната хормонална ос върху хепаринов кофактор II. Този фактор не само изпълнява ролята на кофактор на хепарина, но притежава способността да неутрализира тромбина директно и да активира фибринолитичната система (L. Liu et al., 1995; D. M. Tollefsen, 2002; Y. M. Fortenberry et al., 2004; P. N. Pike et al., 2005). Значимо повишено ниво на хепариновия кофактор след третиране на плъховете с TRH, TSH, T_3 и T_4 (Фигура 55), позволява да се допусне, че той има своя принос за повишаване на фибринолитичната активност.

Друг важен елемент на фибринолитичната система е TAFI, който се активира не само от тромбин, но и от тромбин-тромбомодулиновия комплекс, плазмин и др. (M. Nagashima et al., 2002; F. Biscetti, 2008). Активността на TAFI е значимо намалена (Фигура 56), което считаме, че най-вероятно е резултат от негативен ефект на хормоните на тироидната ос върху неговото активирание или потиснато образуване в хепатоцитите. Силно повишеното плазмено ниво на комплекса TAFIa/TAFIai (Фигура 57) е в съответствие с понижената активност на TAFI (L. Bajzar, 2000; B. N. Bouma, L. O. Mosnier, 2003/2004; A. H. C. Guimaraes et al., 2004. Това дава основание да се приеме, че инхибиращия ефект на TAFI върху фибринолизата е силно намален под влияние на хормоните на оста.

Разгледаните дотук факти убедително показват, че фибринолитичната активност на плазмата най-вероятно е повишена. Това предположение намира пълно потвърждение в значимото намаляване на плазмената концентрация на фибриноген (Фигура 58), силно увеличение на FDP (Фигура 59) и D-dimer (Фигура 60).

Обобщавайки данните за влиянието на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху фибринолизата прави впечатление, че всички хормони имат еднопосочни ефекти, говорещи за повишена активност на тази система. От гледна точка на механизма на действие на тези хормони може да се каже, че те пряко или косвено повлияват биосинтетичната верига на разглежданите фактори, в това число тяхното активиране или инактивиране.

Същевременно трябва да се каже, че резултатите от нашето проучване по отношение на фибринолизата противоречат в известна степен на някои клинични изследвания, касаещи хипертироидни пациенти с удължено време на еуглобулинова лиза, редуцирана фибринолитична активност, понижени нива на плазминоген и увеличен PAI-1 (L.Hofbauer, A. Neufelder, 1997; B. Muller et al., 2001; S. Guldiken et al., 2005). Тези различия трябва внимателно да се обсъждат във връзка с продължителното протичане на заболяването и увреждането на различни органи и системи, както и с ниското ниво на TSH, считано за рисков фактор за тромбози при тези пациенти (M. Meltzer et al., 2009).

6. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

Обобщеният анализ на получените резултати би позволил да се придобие по-пълна представа за ролята на хормоните на тироидната ос в регулацията на хемостазата у плъхове. За целта на проучването са използвани здрави мъжки плъхове Wistar, които бяха третирани с TRH, TSH, T₃ и T₄ в дози близки до физиологичните. Не се установиха данни за хеморагии и тромбогенеза.

За хода на цялото проучване особено значение имаха резултатите произтичащи от ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху интегралните показатели на хемостазата – aPTT, PT, TT, RT и EL. Беше установено (Фигури 1-4), че aPTT, PT, TT и RT са силно удължени ($p < 0.001$), което е убедително доказателство, че използваните хормони променят хемостазата в посока на хипокоагулабилитет. Нещо повече, удълженото aPTT говори за нарушено образуване на протромбиновия комплекс по вътрешната система (R. W. Colman et al., 2006), удълженото PT - за нарушено образуване по външната система (S. Gallistl et al., 2002), а TT и RT - за нарушения в общия краен път на хемокоагулацията.

Скъсеното време за еуглобулинова лиза (Фигура 5) е свидетелство за повишена фибринолитична активност (L. Hofbauer, A. Neufelder, 1997), в дадения случай под влияние на хормоните на тироидната ос.

Разгледаните промени в интегралните показатели, говорещи за намалена съсирваемост и повишена фибринолиза, позволиха да се формулират няколко основни въпроса:

- Кои показатели на коагулантната, антикоагулантна и фибринолитична системи се повлияват?

- Как се осъществяват ефектите на хормоните на тироидната ос – директно или индиректно, т.е. имат ли хормоните на оста автономни ефекти върху органите на хемостазата?
- Какво повлияват тези хормони: биосинтезата, секрецията или активирането на съответните фактори на хемостазата?

Тези въпроси послужиха като основа за конкретизиране на следващите задачи от нашето проучване.

Имайки предвид, че тромбоцитите заемат важно място в хемостазата (R. S. Kasthuri et al., 2010), нашата близка задача беше да проучим влиянието на хормоните на тироидната ос върху броя на тромбоцитите и тяхната функционална активност. Установи се, че броят на тромбоцитите е увеличен значимо под влияние на всички хормони на оста (Фигури 6 и 7). Особено важно е, че заедно с повишения брой тромбоцити се констатира и силно нарастване на процента включен $^{75}\text{Se-M}$ в новообразуваните тромбоцити (Фигури 8 и 9), което е обективен критерий, че TRH, TSH, T_3 и T_4 имат стимулиращ ефект върху тромбоцитите (D.G. Penington, 1969). При изследване на функционалната активност на тромбоцитите, чрез определяне плазменото ниво на $\beta\text{-TG}$ и PF-4, беше установено, че тяхното ниво е силно ($p < 0.001$) редуцирано (Фигури 10 и 11). Намалената плазмена концентрация на тези маркери позволява да се каже, че функционалната активност на тромбоцитите е намалена (M. Fukami et al., 2006), което несъмнено би имало отношение към установената вече намалена съсирваемост на кръвта под влияние на всички хормони на тироидната ос. Засега остава неизяснен въпроса за биологичната целесъобразност на повишения брой тромбоцити под влияние на хормоните на тироидната ос.

Влиянието на хормоните на тироидната ос, върху коагулационната система на хемостазата, беше изследвано чрез определяне на плазмената концентрация и активност на редица показатели. Изхождайки от мястото,

което заемат витамин К-зависимите плазмени фактори на съсирване ние проучихме паралелно промените в антигенната концентрация и активност на факторите II, VII, IX и X под влияние на TRH, TSH, T₃ и T₄. Само TRH и T₃ значимо и едновременно намалиха концентрацията и активността на тези плазмени фактори, видно на фигури 12-19. T₄ също редуцира тези показатели, но само на F II. Специално внимание заслужава TSH, който потиска синтеза и секрецията на всички витамин К-зависими фактори, от хепатоцитите, но не повлиява тяхната активност. Разгледаните промени позволяват да се подчертаят два момента: от една страна – промените имат отношение към данните за хипокоагулабилитет, и, от друга – налице са данни за самостоятелни ефекти на тези хормони, добре показани на фигури 12-19.

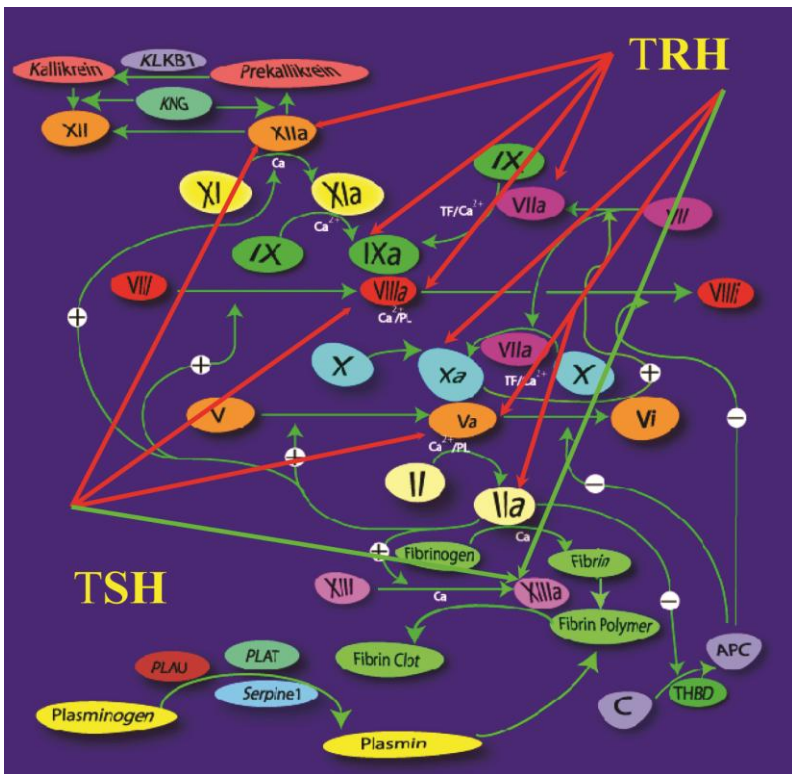
Особено внимание заслужават ефектите на хормоните на тироидната ос върху факторите V, XI, XII и XIII (Фигури 20-23). F V е кофактор на протромбиновия комплекс (X. Du, 2007), а XII има иницираща роля за включване на вътрешния път (R. W. Colman et al., 2006), следователно, тяхното значимо намаляване под влияние на TRH и TSH потиска образуването на протромбиновия комплекс, т.е. потиска се превръщането на протромбина в тромбин. Същевременно TRH и TSH повишават активността на фибрин-стабилизиращия фактор (F XIII) (Фигура 23), което вероятно е механизъм за противодействие на възникналия хипокоагулабилитет. Противоположните ефекти на T₃ и T₄ върху активността на F XIII, видно от същата фигура, е доказателство, че хормоните на тироидната ос имат и автономни ефекти върху хемостазата.

При изследване на ефектите на хормоните на тироидната ос върху F VIII е налице дисоциация между концентрация и активност, като първата е значимо повишена, а втората – намалена (Фигури 24 и 25), което кореспондира с намалената съсирваемост на кръвта. Идентична дисоциация между концентрация и активност се установява и за vWF –

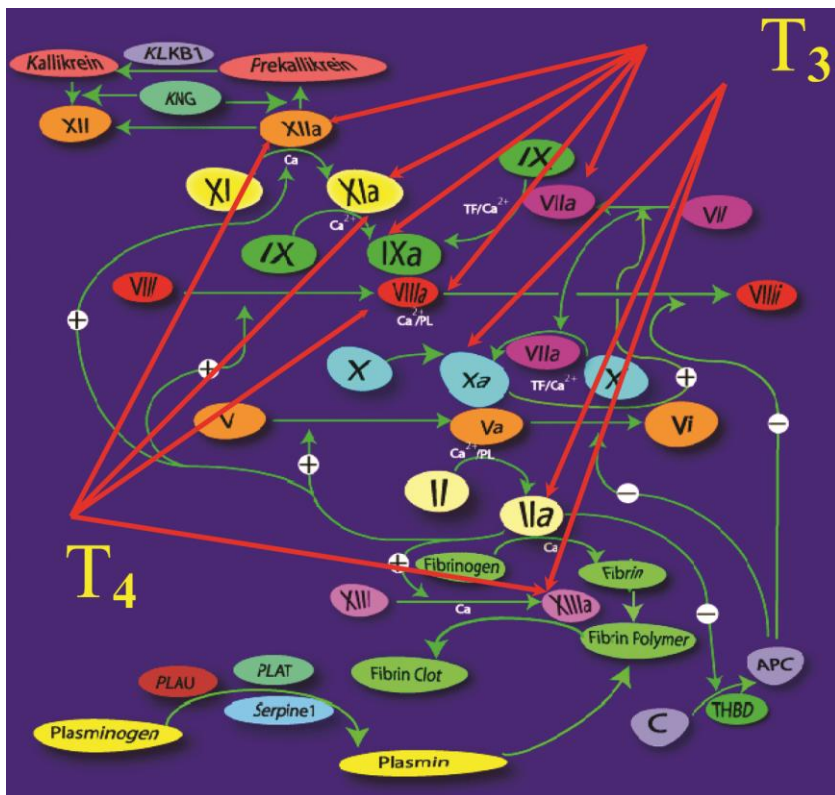
под влияние на всички хормони (Фигури 26-28). Считаме, че този факт най-вероятно има определящо значение за потисната функционална активност на тромбоцитите (Фигури 10 и 11).

Специално внимание в нашите изследвания беше отделено на ефектите на хормоните на тироидната ос върху TF и TFPI. Установеното намалено плазмено ниво на TF (Фигура 29) и повишена активност на свободния TFPI (Фигура 31) се приема като важно доказателство за потиснато образуване на протромбиновия комплекс по външната система.

Казаното дотук за ефектите на хормоните на тироидната ос върху показатели на коагулацията е добре илюстрирано на фигура 61 и фигура 62.



Фиг. 61. Ефекти на TRH и TSH върху активността на плазмени фактори на хемокоагулацията. Червените стрелки показват инхибиране; зелените – активиране.



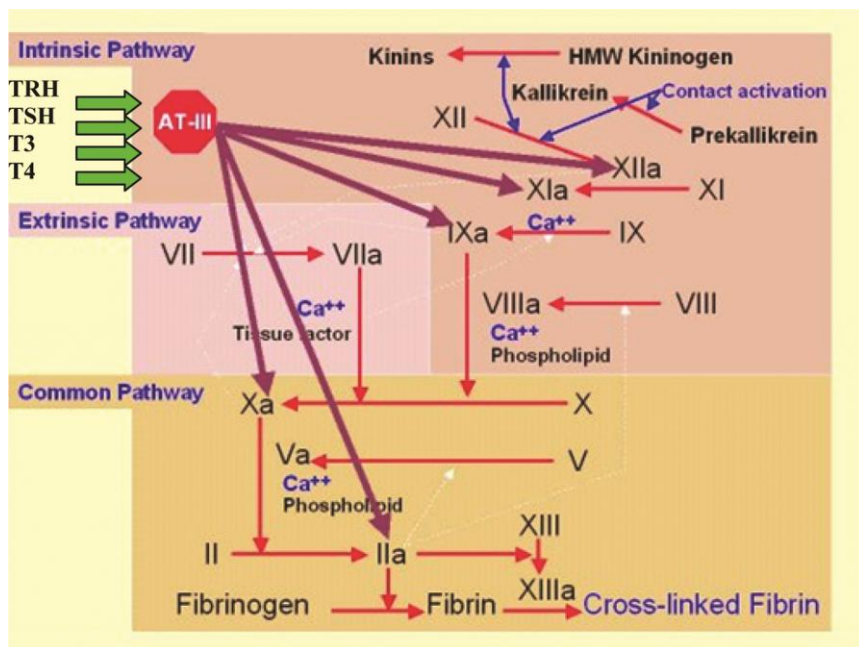
Фиг. 62. Ефекти на T₃ и T₄ върху активността на плазмени фактори на хемокоагулацията. Червените стрелки показват инхибиране.

От първата фигура (Фигура 61) е видно, че TRH и TSH имат доминиращо потискащи ефекти, като нерядко и двата хормона имат такъв ефект върху един и същ фактор на съсирването. Втората фигура, показваща ефектите на T₃ и T₄ също прави впечатление с потискащите ефекти на тези хормони върху възлови фактори на коагулацията.

Ранните етапи на коагулацията се “улавят” много точно чрез тестовете за FPA и PF 1+2, носещи името ранни маркери. Намаленото ниво на FPA, под влияние на T₃ и T₄ (Фигура 32) и на PF 1+2, след третиране на животните с всички хормони (Фигура 33) следва да се разглеждат като потвърждение на установената тенденция към хипокоагулABILитет.

Много показателни са също ефектите на хормоните на тироидната ос върху антикоагулантната система.

Изследванията по отношение на АТ-III показват, че неговата активност е увеличена под влияние на всички хормони (Фигура 35), а комплексът ТАТ е силно намален (Фигура 36), което е нов факт в подкрепа на установената хипокоагулация. Ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ са показани добре на фигура 63.



Фиг. 63. Ефекти на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху активността на антитромбин III. Основни ефекти на антитромбин III. Зелените стрелки означават

стимулация.

Важно място в антикоагулантната система заема протеин С антикоагулантния път. Повишената концентрация на аРС (Фигура 39), както и активността на този показател (Фигура 40) доказват, че хормоните на тироидната ос повишават активността на този път, което се последва от инактивиране на факторите Va и VIIIa (намалява тяхната активност, фигури 20 и 25).

Влиянието на хормоните на тироидната ос върху протеин С-антикоагулантния път са показани на фигура 64.



Фиг. 64. Ефекти на TRH, TSH, T3 и T4 върху активността на протеин С и протеин S. Зелените стрелки показват стимулиращ ефект на съответните хормони. Означения: PC – протеин С; EPCR – ендотелен протеин С рецептор; APC – активиран протеин С, S – протеин S, FVa – активиран фактор V.

Значимо са изразени ефектите на хормоните на тироидната ос и върху показателите на фиринолизата. Установява се, че и четирите хормона увеличават активността на плазминогена (Фигура 45) и концентрацията на

неговия активатор (t-PA: Ag) (Фигура 46), а намаляват активността на PAI-1 (инхибитор на активатора на плазминогена) (Фигура 48), което обуславя повишена активност на фибринолитичната система. Това обяснява значимото намаляване на фибриногена (Фигура 58) и увеличаване на FDP (Фигура 59) и D-dimer (Фигура 60). Повишената фибринолитична активност е свързана със специфични промени във всички изследвани показатели (еднопосочни по отношение на крайния си ефект). Особен интерес представлява намалената активност на α_2 -antiplasmin (Фигура 50) и TAFI: Act (Фигура 56), и повишеното ниво на Heparin Co II: Ag (Фигура 55).

Анализът на резултатите показва, че хормоните на тироидната ос – TRH, TSH, T_3 и T_4 са значим регулатор на хемостазата у плъхове. Налице е тенденция към хипокоагулабилитет и повишена активност на фибринолитичната система. Независимо, че наблюдението е експериментално, би било оправдано повишено внимание с извършване на прецизен лабораторен контрол на хемостазата, при пациенти със субституираща терапия, извършвана с някой от хормоните на оста, както и при пациенти с хиперфункция на щитовидната жлеза.

ИЗВОДИ

1. Хормоните на тироидната ос – TRH, TSH, T₃ и T₄, приложени в три последователни дни на мъжки плъхове Wistar, удължават aPTT, PT, TT и RT и скъсяват еуглобулиновата лиза.
2. Хормоните на тироидната ос стимулират тромбопоезата – видно от увеличени брой на тромбоцитите и процента включен ⁷⁵Se-M в новообразуваните тромбоцити.
3. TRH, TSH, T₃ и T₄ понижават плазмената концентрация на β-тромбоглобулин и тромбоцитен фактор-4, което е израз на потисната реакция на секреция на тромбоцитите.
4. Хормоните на тироидната ос потискат коагулационната активност на двете системи, като намаляват плазменото ниво на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирването – II, VII, IX и X, с изключение на F IX при животните третирани с T₄. TRH и T₃ понижават значимо и активността на тези фактори, докато T₄ само на F II.
5. Хормоните на тироидната ос намаляват плазмената концентрация на TF и активността на F XII, които имат инициращо значение за включване на външния и вътрешния път за образуване на протромбинов активатор.
6. Значимото увеличаване на нивото на aPC, на Protein C: Act и на неговия кофактор Protein S, свидетелстват, че TRH, TSH, T₃ и T₄ повишават активността на антикоагулантния път на протеин С.
7. Налице е дисоциация между концентрация и активност на ефектите на хормоните на тироидната ос върху редица показатели на хемостазата (всички хормони на оста повишават плазмената концентрация на F VIII и vWF, но намаляват тяхната активност; T₃ и T₄ увеличават значимо

активността на АТ-III и на Protein C, но не променят съществено тяхното плазмено ниво).

8. TRH и TSH повишават нивото на общия Protein S, на Protein C: Ag, на АТ-III: Ag, а намаляват активността на F V – без участие на другите елементи на тироидната ос. Това е доказателство за автономни ефекти на тези хормони, данни, каквито се представят в този труд и за T₃, и T₄.
9. Хормоните на тироидната ос увеличават активността на плаземиногена и концентрацията на неговия активатор, а намаляват активността на PAI-1 (инхибитор на активатора на плаземиногена), което обуславя повишена активност на фибринолитичната система и обяснява значимото намаляване на фибриноген и увеличаване на FDP и D-dimer.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Получените резултати имат оригинален характер.

1. Проведено е първо по рода си проучване на ефектите на TRH, TSH, T₃ и T₄ върху 58 показатели на хемостазата, което позволява:
 - да се характеризират ефектите на тези хормони върху коагулантната, антикоагулантна и фибринолитична системи;
 - да се прецизира мястото на действие на хормоните на тироидната ос и изяснат част от механизмите на техните ефекти.
2. Установено е, че всички хормони осъществяват своите ефекти чрез потискане на вътрешната и външна системи на образуване на протромбинов активатор, на конверсията на протромбин в тромбин, а също така и на общия краен път на хемостазата.
3. Показано е, че хормоните на тироидната ос потискат коагулационната каскада и чрез активиране на трите основни антикоагулантни пътя – анти тромбин III, протеин С-антикоагулантния път и TFPI.
4. Установено е, че хормоните на тироидната ос повлияват в голяма част от случаите, както синтезата и секрецията, така и активирането на факторите на коагулантната, антикоагулантната и фибринолитична системи.
5. За първи път е установено, че както TRH и TSH, така и T₃, и T₄ имат самостоятелни ефекти върху хемостазата, понякога дори противоположни на ефектите на останалите елементи на тироидната хормонална ос.

6. Установено е, че хормоните на тироидната ос предизвикват убедителни промени в хемостазата. Налице е тенденция към хипокоагулабилитет и повишена фибринолитична активност на плазмата. Тези данни, независимо, че са експериментални, дават основание за прецизен лабораторен контрол на хемостазата, както при пациенти със субституираща терапия, извършвана с някой от хормоните на оста, така и при пациенти с хиперфункция на щитовидната жлеза.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

СТАТИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

В чуждестранни списания

1. **Негрев, Н.,** Л. Дечева, Е. Станчева, М. Великова. Экспериментальное изучение эффектов тиротропина и тиротропиносвобождающего гормона на тромбоцитопоз и тромбопоэтиновую активность плазмы. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 6, с. 27–30.
2. **Negrev, N.,** R. Radev, M. Velikova, A. Anogeianaki. Screening study of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on hemostasis in rats. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 2006, 20 (3-4), pp 53-57.
3. **Negrev, N.,** R. Radev, M. Velikova, A. Anogeianaki. Effects of the hormones of the thyroid axis on the vitamin K-dependent plasma factors of blood coagulation (II, VII, IX and X). *International journal of immunopathology and pharmacology*, 2008, Vol. 21, no. 1, pp 221-226.
4. **Negrev, N.,** R. Radev, M. Velikova, A. Anogeianaki. Experimental study of the effects of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on platelet functional activity. *European journal of inflammation*, 2008, Vol. 6, no. 1, pp 37-40.
5. **Negrev, N.,** R. Radev, R. Tashev, M. Ivanova. Effects of the hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor plasma levels in rats. *Autonomic & autocoid pharmacology*, 2010, 30, 121-124.
6. **Negrev, N.,** R. Tashev, R. Radev, A. Anogeianaki, M. Ivanova. Hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis are significant

regulators of synthesis and secretion of vitamin K-dependent plasma coagulation factors. *Journal of biological regulators & homeostatic agents*, 2011, Vol. 25, n.1, 21-26.

7. **Negrev, N.,** Y. Nyagolov, M. Stefanova, E. Stancheva. Thyroid hormonal axis regulates protein C anticoagulation pathway in rats. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011, 6 (4), 518-523.

В български списания

8. **Negrev., N.,** Triiodothyronine and thyroxine stimulate thrombocytopoiesis in rats. *Scripta Scientifica Medica*, 1990, vol. 27, pp. 46-51.
9. **Negrev, N.,** Y. Nyagolov, M. Ivanova, R. Radev. Effects of hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on activities and concentrations of plasma clotting factor VIII and Von Willebrand factor on rats. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2010, кн. 6, том 63, 917-924.
10. **Negrev, N.,** Y. Nyagolov, M. Stefanova, N. Doncheva. Effects of the hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on some factors of the fibrinolytic system in rats. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 4, том 64, 607-612.
11. **Negrev, N.,** Y. Nyagolov, M. Stefanova, E. Stancheva. Shifts of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in rats after treatment with hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 5, том 64, 745-750.
12. **Negrev, N.,** Y. Nyagolov, R. Tashev, M. Ivanova. Thyroid hormonal axis modulates fibrinolysis in the rat. Effects of TRH, TSH, T₃ and T₄ on

Fibrinogen, FDP, D-Dimer and Reptilase time. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 8, том 64, 1179-1186.

13. **Negrev, N.**, Y. Nyagolov, R. Tashev, M. Stefanova. The hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis are involved in the regulation of anticoagulation in rats via effects on antithrombin III and thrombomodulin. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 9, том 64, 1329-1336.
14. Nyagolov, Y., **N. Negrev**, R. Tashev, M. Stefanova. Hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis modulate markers of activated blood coagulation in rats. Effects on fibrinopeptide A, prothrombin fragment F₁₊₂, TPA/PAI-1 complex, fibronectin and heparin cofactor II. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 10, том 64, 1499-1506.
15. Nyagolov, Y., **N. Negrev**, R. Tashev, M. Stefanova. Effects of the hormones of thyroid hormonal axis (TRH, TSH, T₃ and T₄) on plasma coagulation factors V, XI, XII and XIII in the rat. *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 11, том 64, 1623-1630.
16. Nyagolov, Y., **N. Negrev**, R. Tashev, M. Stefanova. The hormones of thyroid hormonal axis (TRH, TSH, T₃ and T₄) modulate fibrinolytic system in rats via effects on α 1-antitripsin, α 2-macroglobulin, vitronectin and plasmin- α 2-antiplasmin complex *Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките)*, 2011, кн. 12, том 64, 1757-1764.

МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

Резюмета публикувани в научни списания

17. **Negrev, N., R. Radev, M. Velikova, G. Anogianakis.** Effects of the hypothalamic-pituitary-hormonal axis on hemostasis of rats – a screening study. *La 17-ème sission des journées médicales balkaniques*, Craiova-Roumanie, 12-14 septembre, 2007, p.54-55.
18. **Negrev, N., R. Radev, M. Velikova, G. Anogianakis.** Experimental study on the effects of hypothalamic-pituitary-thyroid hormonal axis on the platelet functional activity. *La 17-ème sission des journées médicales balkaniques*, Craiova-Roumanie, 12-14 septembre, 2007, p. 55.
19. **Negrev, N., Y. Nyagolov, M. Stefanova, E. Stancheva.** The hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis are essential regulators of the activity of protein C anticoagulation pathway in rats. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, Milan, Italy, July 6-9, 2010, p. A 89.
20. **Negrev, N., Y. Nyagolov, M. Stefanova, N. Doncheva.** Effects of the hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on some factors of the fibrinolytic system in rats. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, Milan, Italy, July 6-9, 2010, p. A 102.
21. **Negrev, N., Y. Nyagolov, E. Stancheva, M. Stefanova.** Effects of the hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis on reptilase time, fibrin degradation products and D-dimer in rats. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 8, Supplement s1, 24-28 August, Amsterdam, 2010, p. 59-60.
22. **Negrev, N., Y. Nyagolov, M. Stefanova, E. Stancheva.** Shifts of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in rats after treatment by hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 8, Supplement s1, 24-28 August, Amsterdam, 2010, p. 55.

НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

Резюмета публикувани в научни списания и специализирани издания

23. **Negrev, N., L. Decheva, E. Stancheva.** Experimental investigation of the effects of thyrotropic hormone and thyroliberin on thrombocytopoiesis. *Fifth national congress of physiological sciences*, 10-11 June, Sofia, 1991, p. 31.
24. **Negrev, N., R. Tashev, R. Radev, M. Ivanova.** Hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis are significant regulators of synthesis and secretion of vitamin K-dependent plasma factors of blood coagulation (FII: Ag, FVII: Ag, FIX: Ag and FX: Ag). *IX Национален конгрес на Българското дружество по физиологични науки*, 9-11 ноември, Благоевград, 2007, с. 41.

Изнесени лекции

25. **Negrev, N., R. Radev, R. Tashev, M. Ivanova.** Effects of the hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid axis on tissue factor and tissue-factor pathway inhibitor plasma-levels in rats. *VI National Congress of Pharmacology*, 1-4 October, 2009, Програма, Сертификат, Варна, Поканен лектор.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

СТАТИЯ № 2:

N. Negrev, R. Radev, M. Velikova, A. Anogeianaki. Screening study of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on hemostasis in rats.- *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 20, 2006, No 3-4, 53-57.

Цитирана от:

1. Parakonstantinou P. et al. Impact of porcine orexin a on glucagon plasma concentrations in pigs.- *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21, 2008, No 3, 527-538.
2. Boscolo P. et al. Environmental and occupational stress and autoimmunity.- *Autoimmunity Reviews*, 7, 2008, No 4, 340-343.
3. 张雷, 郭永亮. 席汉综合征患者冠状动脉介入后出血性休克一例.- *Chinese Journal for Clinicians* (Electronic Version), 2, 2008, No 6, 720-722.

<http://www.clinicmed.net/upload/pdf/200809/20080927044852419.pdf>

СТАТИЯ № 3:

N. Negrev, R. Radev, M. Velikova, A. Anogeianaki. Effects of the hormones of the thyroid axis on the vitamin K-dependent plasma factors of blood coagulation (II, VII, IX and X).- *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21, 2008, No 1, 221-226.

Цитирана от:

4. Robuffo I. et al. Upgraded diagnostic value of gen-probe pace 2 assay for detection of chlamydia trachomatis infection.- *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 22, 2008, No 4, 253-261.
5. Мельник И. Р. Нарушения в системе гемостаза у больных с тиреотоксикозом.- *Медицинские новости*, 2008, № 11, 26-29.
6. 张孟瑜, 李波. 肝硬化患者凝血功能监测及临床运用.- *The Journal of Practical Medicine*, 25, 2009, No 20, 3425-3426.

<http://www.syyxzz.com/qikan/manage/wenzhang/0905534.pdf>

7. Magni P. et al. Plasma adiponectin and leptin concentrations in professional rugby players.- *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 24, 2010, No 1, 87-91.
8. Черный В.И. и др. Профилактика тромбоэмболических осложнений у больных, оперируемых по поводу рака щитовидной железы.- *Практическая ангиология*, 2010, № 2, 7 с.
9. Akinci B. et al. The alteration of coagulation in patients with thyroid dysfunction.- *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 5, 2011, No 1, 50-57.
10. Morgan S. Vitamin K & the Thyroid. 18. August 2011.
<http://www.livestrong.com/article/520288-vitamin-k-the-thyroid/>
11. 贺凯 张孟瑜. 巴曲亭与白眉蛇毒血凝酶在肝脏切除手术止血作用的对比.- *China Health Monthly*, 2011, No 7, 261-262.
<http://www.cqvip.com/QK/89637X/201107/39122928.html>

ИМПАКТ ФАКТОР

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПРОФ. Д-Р П. СТОЯНОВ" ВАРНА
БИБЛИОТЕКА С БЮРО ЗА НАУЧНА ИНФОРМАЦИЯ
ул. "Марин Дринов" 55, 9002-Варна, България
e-mail: library@mu-varna.bg, тел. 052 677041



MEDICAL UNIVERSITY "PROF. DR. P. STOYANOV" VARNA
THE LIBRARY AND INFORMATION SERVICE
55 Marin Drinov Str., 9002-Varna, Bulgaria
e-mail: library@mu-varna.bg, phone: +359 52 677041



СПРАВКА

за импакт фактор
на доц. д-р Негрин Несторов Негрев, д.м.

№ на статия от списъка с публи- кации	Заглавие на списание	Година на публикуване	IF
2.	<i>Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents</i>	2006	1,000
3.	<i>International Journal of Immunopathology and Pharmacology</i>	2008	2,793
9.	<i>Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences</i>	2010	0,219
19.	<i>Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis</i>	2010	3,882
20.	<i>Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis</i>	2010	3,882
21.	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>	2010	5,439
22.	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>	2010	5,439
6.	<i>Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents</i>	2011*	2,825
7.	<i>Central European Journal of Biology</i>	2011*	0,685
10.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
11.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
12.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
13.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
14.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
15.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
16.	<i>Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences</i>	2011*	0,219
Общо			27,697

* - IF е за 2010 г.

Справката е изработена в Библиотеката с бюро за научна информация на МУ-Варна.

24.01.2012 г.

Директор на библиотеката при МУ-Варна:

(П. Милева)