

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

---

**Д-р Емилия Станчева-Вълчева**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДОКАЗАТЕЛСТВА  
ЗА РЕГУЛАТОРНИТЕ ЕФЕКТИ  
НА МЕЛАТОНИНА ВЪРХУ КОАГУЛАЦИОННАТА  
И АНТИКОАГУЛАЦИОННА СИСТЕМИ У ПЛЪХОВЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

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

**Варна, 2015**

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

**Д-р Емилия Станчева-Вълчева**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДОКАЗАТЕЛСТВА**  
**ЗА РЕГУЛАТОРНИТЕ ЕФЕКТИ**  
**НА МЕЛАТОНИНА ВЪРХУ КОАГУЛАЦИОННАТА**  
**И АНТИКОАГУЛАЦИОННА СИСТЕМИ У ПЛЪХОВЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“  
Научна специалност „Физиология на животните и човека”

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

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

**Варна, 2015**

Дисертационният труд е написан на 125 страници и съдържа 27 фигури и 4 таблици. Библиографската справка включва 359 заглавия, от които 1 на кирилица и 358 на латиница.

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

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....2015 г. от .....часа в III аудитория на Медицински университет – Варна, ул. „Марин Дринов“, № 55, на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на Медицински университет – Варна.

## СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО .....	8
ЦЕЛ .....	8
ЗАДАЧИ.....	8
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....	9
1. Експериментални животни.....	9
2. Дози и схема на приложение на инжектираните вещества .....	9
3. Процедура по вземане на кръв и получаване на плазма.....	10
4. Хистологично изследване.....	10
5. Изследване на хемостазни показатели .....	11
5.1. Интегрални показатели на хемостазата .....	11
5.2. Плазмени фактори на хемокоагулацията – определяни като активност (Act).....	11
5.3. Плазмени фактори на хемокоагулацията – определяни като антигенна концентрация (Ag) .....	12
5.4. Показатели на протеин С-антикоагулационната система.....	12
6. Статистически анализ на резултатите .....	13
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	14
1. Влияние на мелатонина и инхибитора на неговите ефекти – лузиндол върху коагулационната система на хемостазата.....	14
1.1. Ефекти на мелатонина и лузиндола върху активността на плазмени фактори V, XI, XII, XIII и aPTT.....	14
1.2. Ефекти на мелатонина и лузиндола върху антигенната концентрация и активност на витамин К-зависимите плазмени фактори на коагулацията – F II, F VII, F IX и F X. ....	20
2. Влияние на мелатонина и инхибитора на неговите ефекти – лузиндол върху протеин С - антикоагулационната система на хемостазата.....	28
2.1. Влияние на мелатонин и лузиндол върху плазменото ниво на PC антиген, PC активност и плазменото ниво на APC.....	28
2.2. Ефекти на мелатонина и лузиндола върху нивата на sEPCR и тромбомодулина .....	32
2.3. Ефекти на мелатонина и лузиндола върху антигенното ниво на свободния протеин S и активността на протеин S .....	34

3. Заключително обсъждане .....	37
ИЗВОДИ.....	46
НАУЧНИ ПРИНОСИ.....	47
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	48

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>aPTT</b>	– активирано парциално тромбoplastиново време
<b>APC:Ag</b>	– активиран протеин С, антиген
<b>Free PS:Ag</b>	– свободен протеин S, антиген
<b>L</b>	– лузиндол
<b>M</b>	– мелатонин
<b>MT1/MT2</b>	– мелатонинов рецептор тип 1/тип 2
<b>PC:Ag</b>	– протеин С, антиген
<b>PC:Act</b>	– протеин С, активност
<b>Protein S:Act</b>	– протеин S, активност
<b>sEPCR: Ag</b>	– разтворима форма на ендотелен протеин С рецептор, антиген
<b>TFPI</b>	– инхибитор на пътя на тъканния фактор

## ВЪВЕДЕНИЕ

С термина хомеостаза се означава относителната стабилност на основни физиологични показатели. Едно от важните звена за поддържане на постоянството на вътрешната течна среда на организма е системата на хемостазата. Тя представлява сложен комплекс от процеси, който спира кръвотечението при нараняване на кръвоносните съдове, поддържа течното състояние на кръвта в тях и препятства тромбообразуването. Реализирането на тези ефекти се осъществява с участието на многобройни фактори, свързани с ендотела и субендотела на съдовете, с кръвните клетки, с тъканни фактори, плазмени фактори на коагулационната, антикоагулационна и фибринолитична системи. Между тях съществуват сложни взаимодействия и връзки, които са подложени на прецизна регулация. Съществен дял в тази регулация заема ендокринната система. Участието на редица хормони в регулацията на хемостазата е безспорен факт (L.S. Savendahl et al., 1995; H. Wallaschofski et al., 2003; M. Franchini et al., 2009; S. H. Alzahrani, R. A. Aijjan, 2010). Въпреки това проучванията в тази област продължават в търсене на нови доказателства за ролята на други хормонални фактори, данните за които са по-слабо представени.

Един от интензивно изследваните хормони е мелатонинът, който се идентифицира не само в човек, но и в растения, животни, микроби. Добре известни са ефектите му върху циркадните ритми, имунната система, процесите на стареене, върху съня, върху енергийния метаболизъм и контрола на телото (R.J. Tengattini et al., 2008; G. Paradies et al., 2010; D. X. Tan et al., 2011; K. Celinski et al., 2011). Хормонът привлича вниманието на изследователите не само поради разнообразните му въздействия върху различни тъкани и органи, но и поради факта, че в клиничната практика този хормон се използва като терапевтично средство срещу безсъние, в борбата с неоплазмите, превенция на мигрена, при сърдечно-съдови и хе-

матологични заболявания (V. Srinivasan et al., 2009; T.S. Kandil et al., 2010; P.P. Basu et al., 2010)

Ефектите на мелатонина конкретно върху хемостазата са сравнително слабо проучени. Повечето от съществуващите данни се базират на малки, непълни експериментални или клинични проучвания. Част от експериментите са проведени върху модели на животни с различни увреждания, а не върху интактни животни (T. Tunali et al., 2005). Този факт затруднява интерпретацията на наблюдаваните ефекти поради намеса на допълнителни патогенетични механизми.

Всичко това обосновава необходимостта от провеждане на комплексно проучване на ефектите на мелатонина, приложен в ниски дози на интактни животни, върху хемостазата, и в частност върху коагулационната и антикоагулационна системи.



## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО**

### **ЦЕЛ**

Да се проучи влиянието на мелатонина върху коагулационната и антикоагулационната системи у плъхове.

### **ЗАДАЧИ**

За реализиране на тази цел бяха формулирани следните експериментални задачи:

1. Да се изследва влиянието на мелатонина и инхибитора на неговите ефекти - лужиндол върху хемокоагулацията:
  - Влияние върху плазмените фактори V, XI, XII и XIII.
  - Влияние върху витамин-К-зависимите фактори на хемокоагулацията.
2. Да се проучат ефектите на мелатонина и лужиндола върху протеин С-антикоагулационната система.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ**

Експерименталното проучване беше проведено върху 156 мъжки бели плъха, порода Wistar, от които 117 опитни и 39 контролни. Животните бяха с тегло 200-220 g и се отглеждаха при стандартни условия, свободен достъп до стандартна брикетна храна и вода *ad libitum*, с режим 12 часа светло – 12 часа тъмно. С цел максимално доближаване до този режим на осветеност, опитите бяха проведени през месеците март и септември, за да се използват пролетното и есенно равноденствие. Всички експерименти с животни бяха проведени съгласно изискванията на местното и международно законодателство.

### **2. ДОЗИ И СХЕМА НА ПРИЛОЖЕНИЕ НА ИНЖЕКТИРАНИТЕ ВЕЩЕСТВА**

След направената литературна справка не беше получена информация относно дозата, която би следвало да се използва за експериментални цели. В тази връзка беше проведено собствено проучване, в което се използваха по 4 дози за мелатонин и съответно за лузиндол. За работна доза се приемаше най-ниската доза, при използването на която се наблюдаваха значими промени в изследваните показатели – фактори на съсирващата и противосъсирващата системи.

Животните бяха разпределени в 4 еднакви групи – една контролна и три опитни с равен брой животни в група. Третирането се извършваше подкожно в три последователни дни, два пъти дневно през 12 часа. Първата (контролна) група плъхове се инжектираше с физиологичен разтвор – разтворител на мелатонина и лузиндола, втората група – с мелатонин

(Merk, Germany) в денонощна доза 0,2 мг/кг телесна маса, третата група - с лузиндол (Sigma Chemicals/St. Louis, MO, USA) в денонощна доза 0,4 мг/кг телесна маса, четвъртата група - с мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол при същата процедура и дози. Мелатонинът и лузиндолът бяха във вид на субстанция и се разтваряха *ex tempore*. Контролната група се третираше с физиологичен разтвор, по същата схема и количество разтвор. Продължителността на всяко наблюдение беше в рамките на 72 часа.

### **3. ПРОЦЕДУРА ПО ВЗЕМАНЕ НА КРЪВ И ПОЛУЧАВАНЕ НА ПЛАЗМА**

Необходимият обем кръв се вземаше от плъхове под уретанова наркоза чрез кардиална пункция с еднократна спринцовка в количество около 4,5 ml. Кръвта се смесваше с антикоагулант в съотношение 9:1. При повечето от изследваните показатели като антикоагулант беше използван натриев цитрат 0,11mmol/l. Цитратната кръв се центрофугираше за 10 минути в хладилна центрофуга при +4°C и 3000 оборота в минута. Единият от изследваните параметри – aPTT, беше определян до втория час след отделянето на плазмата. За останалите показатели цитратната плазма се замразяваше при -60°C и показателите се определяха до десетия ден.

### **4. ХИСТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ**

След вземане на кръв вътрешните органи на животните бяха инспектирани макроскопски. Бяха подготвени препарати от вътрешни органи – черен дроб, тънко черво, бъбрек и оцветявани с хематоксилин и еозин и по Weigert за фибрин. Препаратите бяха оглеждани на светлинен микроскоп за възможни микрочръвоизливи и/или вътресъдови съсиреци.

## 5. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХЕМОСТАЗНИ ПОКАЗАТЕЛИ

Промените в изследваните от нас 20 показателя бяха регистрирани чрез използване на някой от следните методи: кинетични, хромогенни и ELISA.

### 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.

### 5.2. ПЛАЗМЕНИ 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 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.

### 5.3. ПЛАЗМЕНИ ФАКТОРИ НА ХЕМОКОАГУЛАЦИЯТА – ОПРЕДЕЛЯНИ КАТО АНТИГЕННА КОНЦЕНТРАЦИЯ (Ag)

**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 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. ПОКАЗАТЕЛИ НА ПРОТЕИН С-АНТИКОАГУЛАЦИОННАТА СИСТЕМА

**Protein C: Act (Protein C, activity)**, протеин C, активност, определян чрез ELISA метод с кит на 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;

**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;

**Thrombomodulin: Ag (Thrombomodulin, antigen)**, тромбомодулин антиген, определян чрез IMUBIND®ELISA kit, American Diagnostica inc., USA;

**Protein S: Act (Protein S, activity)**, протеин S активност, определян чрез ELISA метод с 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.

## **6. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Статистическата обработка на резултатите беше извършена с помощта на софтуерен продукт GraphPad Prism 5. Бяха изчислени относителният дял при определяне нивата на показателите, средните стойности, статистическото разсейване и статистическата грешка при определяне на средни нива на показателите.

Резултатите бяха обработени чрез вариационен анализ при използване на t-теста на Student-Fisher. Стойности на  $p < 0.05$  се считаха за статистически значими.

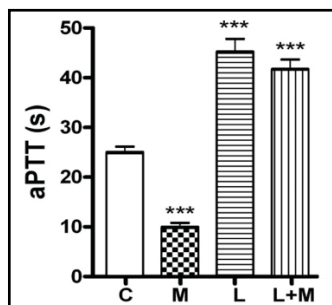
Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната ( $\bar{x} \pm S \bar{x}$ ).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. ВЛИЯНИЕ НА МЕЛАТОНИНА И ИНХИБИТОРА НА НЕГОВИТЕ ЕФЕКТИ – ЛУЗИНДОЛ ВЪРХУ КООГУЛАЦИОННАТА СИСТЕМА НА ХЕМОСТАЗАТА

#### 1.1. ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИНА И ЛУЗИНДОЛА ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ПЛАЗМЕНИ ФАКТОРИ V, XI, XII, XIII И aPTT

Резултатите, представени на фигура 1 показват, че тридневното приложение на мелатонин скъсява aPTT от  $24,92 \pm 1,24$  s (контролна група) до  $9,88 \pm 0,91$  s ( $p < 0.001$ ). Лузиндолът удължава aPTT до  $45,13 \pm 2,68$  s ( $p < 0.001$ ). Претретирането с лузиндол повтаря този ефект, като удължава-нето на aPTT е до  $41,65 \pm 1,98$  s ( $p < 0.001$ ).

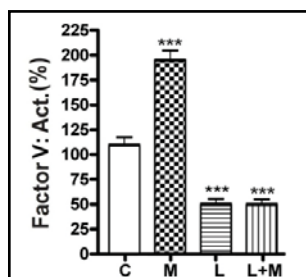


**Фиг. 1.** Ефекти на мелатонин ( $0,2$  mg/kg b.w.), лузиндол ( $0,4$  mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху aPTT (активирано парциално тромбoplastиново време). Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

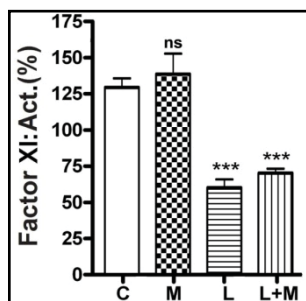
Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Ефектите на мелатонина и неговия неселективен рецепторен антаго-

нист лузиндол върху активността на плазмени фактори V, XI, XII и XIII са представени на фигури 2-5 и таблица 1.

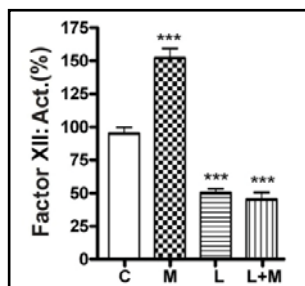


**Фиг. 2.** Влияние върху активността на плазмен фактор V (Factor V: Act) у мъжки плъхове порода Wistar, третирувани с селен с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

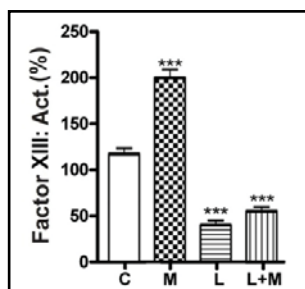


**Фиг. 3.** Активност на плазмен фактор XI (Factor XI: Act) у мъжки плъхове порода Wistar, третирувани с селен с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L – лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; n.s.- без значимост.





**Фиг. 4.** Промени в активността на плазмен фактор XII (Factor XII: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c., 2 пъти дневно в три последователни дни с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M – мелатонин; L – лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm Sx$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .



**Фиг. 5.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху активността на плазмен фактор XIII (Factor XIII: Act). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M – мелатонин; L – лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm Sx$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

**Табл. 1.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно в три последователни дни върху активността (Act) на F V, F XI, F XII и F XIII.

Инжектирано вещество	F V: Act.	F XI: Act.	F XII: Act.	F XIII: Act.
Мелатонин (n=13)	195,10 ±9,68 p<0,001	138,50 ±14,22 n. s.	151,90 ±7,44 p<0,001	199,80 ±9,06 p<0,001
Лузиндол (n=13)	50,05 ±5,34 p<0,001	60,02 ±5,89 p<0,001	50,04 ±3,29 p<0,001	40,08 ±5,20 p<0,001
Лузиндол + мелатонин (n=13)	49,76 ±5,30 p<0,001	70,07 ±3,15 p<0,001	45,17 ±5,53 p<0,001	55,05 ±4,77 p<0,001
С (контролни) Физиологичен разтвор (n=13)	109,40 ±8,15	129,30 ±6,48	95,00 ±4,65	117,00 ±6,71

С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като  $\bar{X} \pm S\bar{X}$ .

В проучването се проследява влиянието на триденното третиране на плъховете с мелатонин върху aPTT - един коагуляционен тест за оценка функциите на факторите от вътрешната система и общия краен път за образуване на протромбинов активатор (S.P. Вајај, J.H. Joist, 1999). Получените резултати (фигура 1) показват значимо скъсяване на aPTT (p<0,001), което е свидетелство за повлияване на хемостазата в посока на хиперкоагулабилитет. Трите изследвани плазмени фактори на съсирването - ФV, ФXI и ФXII са част от факторите, чиито функции се оценяват чрез aPTT - един интегрален показател на коагулацията. Плазмен фактор XII (фактор на контакта) иницира вътрешната система за образуване на протромбинов активатор и се явява ключово звено за функционирането на тази система

(C.G. Cochrane, J.H.Griffin, 1979, T.Renné, D.Gailani, 2007). Плазмен фактор V (проакцелерин) е част от общия краен път на вътрешната и външната системи за образуване на протромбиновия ативатор (G. Nicolaes, A., B. Dahlbäck, 2002; K. Segers et al., 2007). Коагулационен фактор XI принадлежи към така наречената контактна група плазмени фактори, които се активират по вътрешния път и включва още фактор XII, фактор IX, прекаликреин и високомолекулен кининоген (P. N.Walsh, 2001).

В това проучване тридневното прилагане на мелатонин на плъхове повишава активността ( $p < 0,001$ ) на плазмените фактори на коагулацията ФV (фигура 2), ФXII (фигура 4) и ФXIII (фигура 5), докато активността на ФXI (фигура 3) се повлиява незначимо. Така посочените данни могат да бъдат интерпретирани като възможен белег за стимулиране биосинтезата на ФV, ФXII и ФXIII. Добре известен е фактът, че основно значение за синтезата на плазмените фактори на съсирването има черният дроб (E. M. Gordon et al., 1990; R. Kerr, 2003). Съществуват литературни данни, доказващи положителните ефекти на мелатонина върху протеиновата синтеза в хепатоцити на плъхове и промените, наблюдавани след прилагане на неселективния инхибитор на мелатониновите рецептори - лузиндол (V.Y. Brodsky, N.D. Zvezdina, 2010; V.Y. Brodsky et al., 2010). Трудно бихме използвали тези факти за определяне механизма на действие на хормона, но е много вероятно неговият стимулиращ ефект да се реализира на нивото на черния дроб. Предвид широкото представяне на мелатониновите рецептори в различни области на ЦНС (P.A. Witt-Enderby et al., 2003) е редно да влязат в съображение и възможни ефекти на хормона на централно ниво върху други системи за регулация на хемокоагулацията. Повишената активност на плазмените фактори на коагулацията ФV, ФXII и ФXIII под влияние на мелатонина е в съответствие с установените промени в aPTT и показва тенденция към хиперкоагулабилитет. Може да се приеме,

че пряко отношение към скъсеното аРТТ под влияние на мелатонина, има установената повишена активност на ФV и ФХII след прилагането на този хормон.

Самостоятелното приложение на лузиндол в това проучване се последва от значимо понижение ( $p < 0,001$ ) нивата на активност на проследяваните плазмени фактори на коагулацията – фигури 2-5. Може да се допусне, че този ефект е проява на потисната продукция на изследваните плазмени фактори. Това би могло да е свързано с едно от основните свойства на лузиндола да инхибира мелатониновите ефекти в качеството му на неселективен блокер на MT1 и MT2 рецептори (M.L. Dubocovich, 1988; U.M. A. Renzi et al., 2011; Umit et al., 2012). Описаното потискане на ключови фактори на съсирващата система след прилагане на лузиндол, е в съответствие със значимото удължаване на аРТТ ( $p < 0,001$ ) (фигура 1) под влияние на този мелатонинов рецепторен антагонист и е доказателство за прякото участие на MT1 и MT2 при реализиране ефектите на мелатонина върху коагулацията.

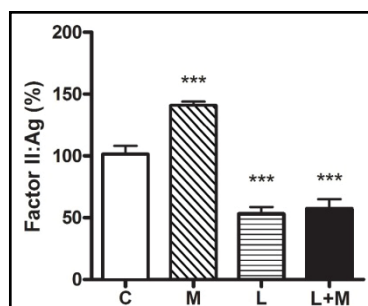
Третирането на плъхове с мелатонин един час след претретиране с лузиндол предизвиква значимо понижение нивата на активност ( $p < 0,001$ ) на проследяваните плазмени фактори на коагулацията – фигури 2-5. Ефектът по отношение на аРТТ (фигура 1) е в посока на силно удължаване ( $p < 0,001$ ) и кореспондира с изложените резултати за активността на плазмените коагулационни фактори. Прави впечатление, че промените при всички показатели след приложението на лузиндол са в противоположна посока на промените при същите показатели след третирането с мелатонин и показват тенденция към хипокоагулабилитет.

1.2. ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИНА И ЛУЗИНДОЛА ВЪРХУ АНТИГЕННАТА КОНЦЕНТРАЦИЯ И АКТИВНОСТ НА ВИТАМИН К-ЗАВИСИМИТЕ ПЛАЗМЕНИ ФАКТОРИ НА КООГУЛАЦИЯТА – F II, F VII, F IX И F X.

1.2.1. Най-напред беше проследено влиянието на мелатонина и лузиндола върху плазменото ниво на витамин К-зависимите плазмени фактори на коагулацията – F II, F VII, F IX и F X.

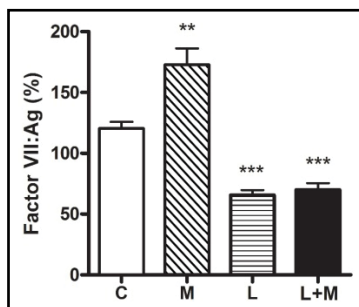
Ефектите на мелатонин и лузиндол върху синтеза и секрецията на витамин К-зависимите коагулационни фактори се оценяват по нивата на тяхната антигенна концентрация, т.е. определя се плазмената концентрация на F II: Ag, F VII: Ag, F IX: Ag и F X: Ag.

Резултатите са представени на фигури 6-9 и в таблица 2, както следва:

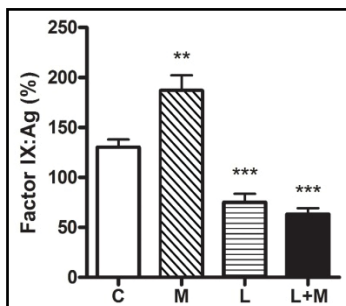


**Фиг. 6.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху плазменото ниво на Factor II:Ag (антиген). Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

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

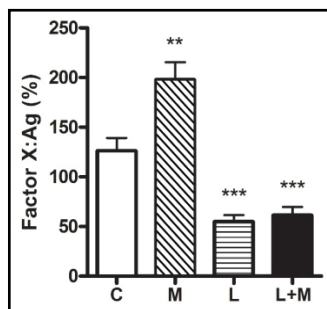


**Фиг. 7.** Динамика на плазменото ниво на Factor VII:Ag (антиген) у мъжки Wistar плъхове, третиранис.с. мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



**Фиг. 8.** Промени в плазменото ниво на Factor IX:Ag (антиген) у мъжки Wistar плъхове, инжектирани с.с. с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



**Фиг. 9.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху плазменото ниво на Factor X:Ag (антиген). Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

**Табл. 2.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно в три последователни дни върху плазмените нива на F II: Ag, F VII: Ag, F IX: Ag и F X: Ag.

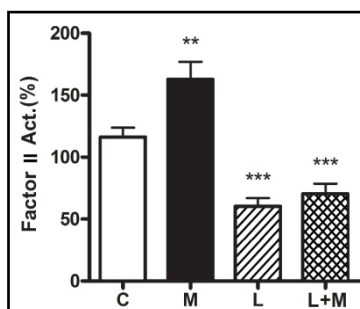
Инжектирано вещество	F II: Ag	F VII: Ag	F IX: Ag	F X: Ag
Мелатонин (n=13)	140,60 ±3,34 p<0,001	172,60 ±13,60 p<0,01	187,00 ±15,12 p<0,01	197,80 ±17,68 p<0,01
Лузиндол (n=13)	53,15 ±5,51 p<0,001	65,50 ±4,31 p<0,001	75,03 ±8,58 p<0,001	54,80 ±6,80 p<0,001
Лузиндол + мелатонин (n=13)	57,18 ±7,79 p<0,001	69,96 ±5,43 p<0,001	63,20 ±6,09 p<0,001	61,45 ±8,37 p<0,001
C(контролни) Физиологичен разтвор (n=13)	101,30 ±6,74	120,30 ±5,53	130,20 ±7,81	126,10 ±13,10

C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

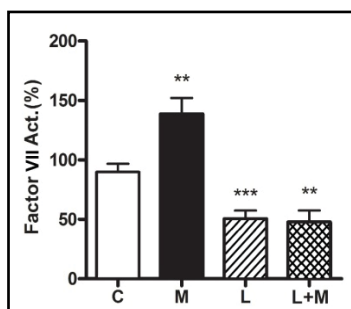
Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ .

1.2.2. Беше проучено влиянието на мелатонин и лузиндол върху активността (Act) на витамин К-зависимите плазмени фактори на коагулацията – F II, F VII, F IX и F X.

Резултатите са представени на фигури 10-13 и таблица 3, както следва:

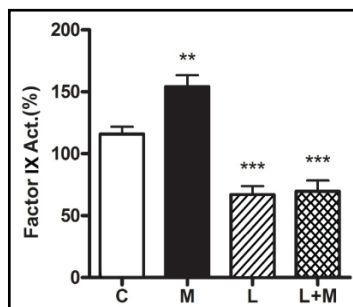


**Фиг. 10.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху активността на плазмен фактор II (Factor II: Act). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



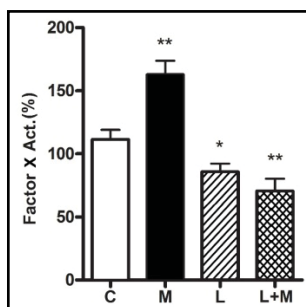
**Фиг. 11.** Промени в активността на плазмен фактор VII (Factor VII: Act) у мъжки плъхове Wistar, третираны s.c., 2 пъти дневно в три последователни дни с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. M - мелатонин; L – лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0,01$ .





**Фиг. 12.** Активност на плазмен фактор IX (Factor IX: Act) у мъжки плъхове Wistar, третирани s.c., 2 пъти дневно в три последователни дни с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор. M - мелатонин; L – лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Фиг. 13.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху активността на плазмен фактор X (Factor X: Act). C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \* -  $p < 0,05$ .

**Табл. 3.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно в три последователни дни върху активността (Act) на F II, F VII, F IX и F X.

Инжектирано вещество	F II: Act.	F VII: Act.	F IX: Act.	F X: Act.
Мелатонин (n=13)	162,80 ±14,07 p<0,01	138,60 ±13,46 p<0,01	154,10 ±9,37 p<0,01	162,60 ±11,08 p<0,001
Лузиндол (n=13)	60,40 ±6,52 p<0,001	50,45 ±7,04 p<0,001	66,84 ±6,99 p<0,001	85,65 ±6,58 p<0,05
Лузиндол + мелатонин (n=13)	70,44 ±8,14 p<0,001	47,83 ±9,61 p<0,01	69,56 ±8,90 p<0,001	70,42 ±9,94 p<0,01
С (контролни) Физиологичен разтвор (n=13)	116,10 ±7,59	89,56 ±7,13	116,00 ±5,74	111,40 ±7,68

С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор.

Данните са представени като  $\bar{X} \pm S\bar{X}$ .

Специалното внимание към групата на витамин К-зависимите плазмени коагулационни фактори от една страна е свързано с особеното място, което заемат в коагулацията (J.C.Souto et al., 2001). Добре известно е, че фактор IX участва във вътрешния път на образуване на протромбинов активатор, фактор VII е инициращ фактор на външния път, докато фактори II и X са елементи на общия краен път на коагулацията (Y. Hong et al., 1999; S. Gallistl et al., 2002; S.E. Lind et al., 2003; R.W. Colman et al., 2006). От друга страна въпреки различията, се отбелязва наличието на редица общи характеристики между тях. Една от тях се изразява в това, че черният дроб е място на синтез и гама-глутамил карбоксилиране на витамин К-зависимите плазмени коагулационни протеини (E. G. Bovill et al., 1993; G.A. Miggiano, L.Robilotta, 2005). Необходимо условие за пост-

ранслационното карбоксилиране на остатъците глутаминова киселина се явява наличието на витамин К (М. Пенев, П. Дукова-Пенева, 2007). Недостатъчното количество витамин К в организма в резултат на нарушени усвояване и метаболизъм на витамин К (I.V. Kirgizov et al., 2001; G.A. Miggiano, L.Robilotta, 2005), при медикаментозни поражения на черния дроб (R. Kerr, 2003; T.T. Knudsen et al., 2005), както и при провеждане на антикоагулантна терапия (R. Baker et al., 2004; M. Bern, 2004), се съпровождат с нарушения в процеса на карбоксилирането и имат за резултат нарушения в биологичната активност на витамин К-зависимите фактори (P.K. Bandyopadhyay, 2008) и разстройства в хемостазата (G.A. Miggiano, L.Robilotta, 2005; R.W. Colman et al., 2006). Карбоксилните остатъци на гама-карбоксиглутаминовата киселина са необходими за свързване с калциевите йони и взаимодействието с фосфолипидните повърхности (М. Пенев, П. Дукова-Пенева, 2007). Дефицитът на витамин К-зависимите коагулационни фактори причинява кървене (E.Pichler, L. Pichler, 2008; A. Girolami et al., 2008).

Анализът на влиянието на мелатонина върху плазменото ниво на фактори FII:Ag, FVII:Ag, FIX:Ag, FX:Ag (фигури 6-9) показва еднопосочен ефект, а именно значимо повишаване. Точният анализ на тези промени установява разлика в силата на ефекта на мелатонина, като плазменото ниво на фактор II (фигура 6) е повишено в по-голяма степен ( $p < 0,001$ ), докато ефектът върху концентрацията на останалите фактори VII, IX и X (фигури 7-9) е по-слабо изразен ( $p < 0,01$ ). Установеното значимо повишение на концентрацията на коагулационните фактори може да израз на стимулирани синтеза и секреция.

Паралелно с изследване ефекта на мелатонина върху синтезата и секрецията на витамин К-зависимите коагулационни фактори е проучено влиянието на мелатонина върху активността на тези плазмени фактори. От фигури 10-13 е видно, че хормонът значимо увеличава активността на

всички плазмени фактори от тази група, като повишението активността на ф X е по-силно изразено ( $p < 0,001$ ).

Специфично е влиянието на лузиндола – той супресира както синтеза на витамин К-зависимите коагулационни фактори (фигури 6-9), така и тяхната активност (фигури 10-13).

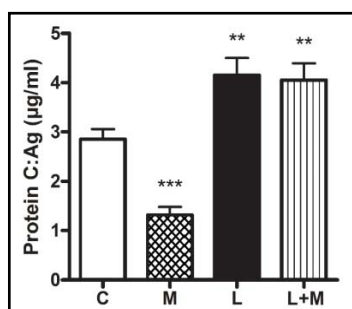
Претретирането с лузиндол не само наподобява ефектите при самостоятелната апликация на лузиндол, но напълно премахва стимулиращия ефект на екзогенния мелатонин върху изследваните плазмени фактори (фигури 6-13).

Така представените резултати сочат повишена съсирваемост на кръвта под влияние на мелатонина, като същевременно поставят въпроса, доколко наблюдаваните ефекти са свързани с повлияване на биосинтезата, с активирането или с витамин К-зависимото гама-глутамил карбоксилиране на факторите. Данните не ни позволяват да се установи точното място и механизъм на действие на хормона и неговият антагонист – лузиндола. Най-вероятно те повлияват биосинтезата на витамин К-зависимите плазмени фактори в черния дроб, ефект, който се опосредства от MT1/MT2 мелатонинови рецептори. Съществуват литературни данни, илюстриращи широкото разпространение на тези мембранни рецептори в различни тъкани и органи, в това число и в черния дроб на плъхове (R.M. Slominski et al., 2012; C. Venegas et al., 2013). Наблюдаваното понижение както на плазменото ниво, така и на активността на витамин К-зависимите плазмени коагулационни фактори под влияние на неселективния рецепторен антагонист на мелатонина – лузиндол, предполага ангажиране на MT1/MT2 рецептори при реализиране на мелатониновите ефекти. Тези промени недвусмислено сочат, че мелатонинът в приложените схеми и дози у плъхове, води до повишаване на плазмената концентрация и активността на витамин К-зависимите коагулационни фактори, което потвърждава повлияването на хемокоагулацията в посока на хиперкоагулабилитет.

## 2. ВЛИЯНИЕ НА МЕЛАТОНИНА И ИНХИБИТОРА НА НЕГОВИТЕ ЕФЕКТИ – ЛУЗИНДОЛ ВЪРХУ ПРОТЕИН С - АНТИКОАГУЛАЦИОННАТА СИСТЕМА НА ХЕМОСТАЗАТА

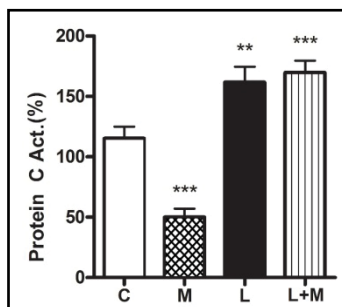
### 2.1. ВЛИЯНИЕ НА МЕЛАТОНИН И ЛУЗИНДОЛ ВЪРХУ ПЛАЗМЕНОТО НИВО НА РС АНТИГЕН, РС АКТИВНОСТ И ПЛАЗМЕНОТО НИВО НА АРС

Ефектите на мелатонина и неговият рецепторен антагонист – лузиндол върху РС-антикоагулационната система са представени на фигури 14-20 и таблица 4.

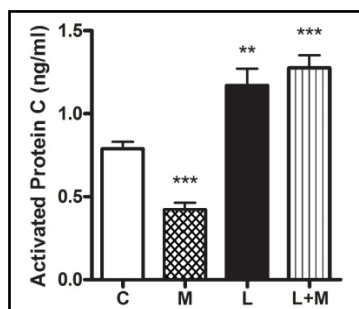


**Фиг. 14.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху плазменото ниво на протеин С (Protein C:Ag.) Използвани съкращения: С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; М - мелатонин; L - лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



**Фиг. 15.** Плазмена активност на протеин C (Protein C: Act) у мъжки плъхове порода Wistar, третираны s.c. с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



**Фиг. 16.** Динамика на плазменото ниво на активирания PC (APC:Ag) у мъжки Wistar плъхове, третираны s.c. с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$

**Табл. 4.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху плазменото ниво на протеин С (РС:Ag), върху активността на протеин С(РС: Act) и върху активирания протеин С(АРС:Ag)

Инжектирано вещество	РС: Ag	РС: Act	АРС: Ag
Мелатонин (n=1)	1,32 ± 0,16 p < 0.001	50,13 ± 6,98 p < 0.001	0,42 ± 0,04 p < 0.001
Лузиндол (n=13)	4,15 ± 0,35 p < 0.01	161,70 ± 12,91 p < 0.01	1,17 ± 0,10 p < 0.01
Лузиндол + мелатонин (n=13)	4,05 ± 0,34 p < 0.01	169,70 ± 9,83 p < 0.001	1,28 ± 0,07 p < 0.001
С(контролни) Физиологичен разтвор (n=13)	2,85 ± 0,21	115,20 ± 9,72	0,79 ± 0,04

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$

Един от важните елементи на антикоагулационните механизми е протеин С-антикоагулационната система, която включва мембраносвързани и циркулиращи протеини: протеин С, тромбомодулин, sEPCR и протеин S (F.J. Castellino et al., 2009). Ключова роля в протеин С-антикоагулационната система изпълнява протеин С - витамин К-зависим гликопротеин, синтезиран в хепатоцитите и циркулиращ в плазмата като неактивен зимоген (F. Espana et al., 2005). От резултатите, представени на фигура 14, е видно, че нивото на РС:Ag в плазмата на плъховете, инжектирани с мелатонин, е сигнификантно намалено. Това би могло да е индикация за потискане синтеза на РС. По всяка вероятност процесът се опосредства от мелатониновите МТ1/МТ2 мембранни рецептори, факт, който се подкрепя от наблюдава-

ното повишение на концентрацията на РС (фигура 14) след прилагане на неселективния мелатонинов рецепторен антагонист – лузиндол.

Неактивният зимоген ефективно се активира върху повърхността на ендотелни клетки от тромбин, свързан към мембрания протеин тромбомодулин (B.Dahlbäck, B.O. Villoutreix, 2005). Разтворимият ендотелен рецептор за РС допълнително стимулира активирането на РС чрез свързване с РС, след което го предоставя на активирация тромбин-тромбомодулинов комплекс (C.T. Esmon, 2003). APC съвместно с неговите кофактори и клетъчни рецептори образува специфични макромолекулни комплекси за осигуряване на ефективна протеолиза на мултиплени субстрати като фактор Va и фактор VIIIa, което има за резултат антикоагулантен ефект (F.Stavenuiter, 2013).

От фигури 15-16 е видно, че APC и активността на РС бяха едновременно намалени под влияние на мелатонина, ефект който напълно се премахва под влияние на мелатониновия рецепторен антагонист – лузиндол. Специално внимание заслужава фактът, че концентрацията и активността на РС и APC са различни показатели, имащи отношение не само към синтеза, но и към етапите на активиране на РС, като не винаги концентрацията на APC съвпада с измерената активност (F. España et al., 2001). Противно на тези твърдения, наблюдаваните от нас промени в трите параметъра под влияние на мелатонина са еднопосочни и свидетелстват за потискане активността на протеин С-антикоагулационната система и за проява на тенденция към хиперкоагулабилитет.

Лузиндолът е първият, но не и единствен лиганд, описан като конкуритивен рецепторен антагонист на мелатонина (M.L. Dubocovich, 1988). Самостоятелно приложеният лузиндол и претретирането с него (фигури 14-16) бяха последвани от повишение на антигенната концентрация и активност на протеин С и повишение на активирания протеин С. Така описаните промени в ключовите елементи на протеин С-антикоагула-

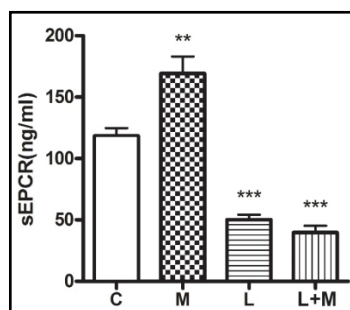


ционната система под влияние на лузиндола, биха могли да се тълкуват като доказателство за участието на MT1/MT2 рецептори при реализиране ефектите на мелатонина върху коагулацията.

## 2.2. ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИНА И ЛУЗИНДОЛА ВЪРХУ НИВАТА НА sEPCR И ТРОМБОМОДУЛИНА

Тромбомодулинът и EPCR са трансмембранни ендотелни рецептори, въввлечени в РС-антикоагулационната система и регулиращи както коагулационни, така и възпалителни процеси (E. Viguzzi et al., 2007).

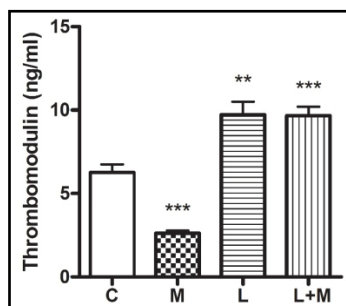
От фигура 17 е видно, че тридневното приложение на мелатонин води до повишение на sEPCR от  $118,40 \pm 6,36$  ng/ml (контролна група) до  $169,20 \pm 13,86$  ng/ml ( $p < 0.01$ ). След самостоятелното прилагане на лузиндол, както и след претретиране с него се наблюдава понижаване на sEPCR, като регистрираните стойности спрямо контролната група животни са съответно  $50,19 \pm 4,00$  ng/ml ( $p < 0.001$ ) и  $39,69 \pm 5,51$  ng/ml ( $p < 0.001$ ).



**Фиг. 17.** Промени в плазмената концентрация на разтворимата форма на ендотелен протеин С рецептор (sEPCR:Ag) у мъжки Wistar плъхове, третирани s.c. с мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; М - мелатонин; L - лузиндол. Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

ЕРСР е изолиран и клониран като ендотелен клетъчно специфичен, високо селективен и високо афинитетен свързващ протеин за РС и АРС (К. Fukudome, С. Т. Esmon, 1994). Разтворимата форма sЕРСР, която възниква при протеолитичното разцепване на мембранно свързаната форма, може да свърже АРС и да го лиши от антикоагулационната му функция (Е. Ducros et al., 2012). При нашето проучване установихме сигнификантно повишение на sЕРСР (фигура 17). Повишеното ниво на sЕРСР в плазмата корелира с наблюдаваното от нас понижение на АРС.

Самостоятелното приложение на неселективния мелатонинов антагонист – лузиндол, както и претретирането с него предизвика противоположни промени в плазменото ниво на sЕРСР (фигура 17). Наблюдаваното понижение на sЕРСР е в съответствие с активирането на ключови елементи от протеин С-антикоагулационната система под влияние на лузиндола и би могло да бъде проява на инхибиране на мелатониновите ефекти, опосредствано от MT1/MT2 рецептори.



**Фиг. 18.** Ефекти на мелатонин (0,2 mg/kg b.w.), лузиндол (0,4 mg/kg b.w.) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), всички приложени s.c. на мъжки Wistar плъхове, 2 пъти дневно, в три последователни дни върху тромбомодулина. Използвани съкращения: С – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; М - мелатонин; L - лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

На фигура 18 са представени данните, илюстриращи ефекта на мелато-

нина върху нивото на тромбомодулина и показват намаляване от  $6,26 \pm 0,48$  ng/ml (контролна група) до  $2,62 \pm 0,16$  ng/ml ( $p < 0.001$ ). Самостоятелно приложеният лузиндол повишава тромбомодулина до  $9,72 \pm 0,79$  ng/ml ( $p < 0.01$ ). Претретирането с лузиндол показва по-силно изразено повишаване на тромбомодулина до  $9,67 \pm 0,54$  ng/ml ( $p < 0.001$ ).

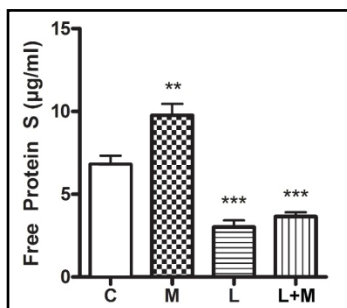
Тромбомодулинът – повърхностно експресиран гликопротеин, синтезиран от съдовите ендотелни клетки, е важен кофактор на тромбин-медираната активация на РС, процес допълнително усилян от sEPCR (M. Van de Wouwer et al., 2004). Тромбомодулинът свързва тромбин, директно инхибирайки неговия потенциал за съсирване, докато в същото време повишава активирането на РС и активира тромбин-активируемия инхибитор на фибринолизата (TAFI) (C. T. Esmon, 2003). Триденното прилагане на мелатонин в нашето изследване (фигура 18) предизвиква достоверно намаляване на тромбомодулина, резултат който корелира с установените промени в нивото на РС:Ag, РС:Act и APC и е в посока потискане активността на РС-антикоагулационната система и тенденция към хиперкоагулабилитет.

Самостоятелното приложение на неселективния мелатонинов антагонист – лузиндол, както и претретирането с него и при двата мембранни рецептора предизвика промени в противоположна посока на промените при същите показатели след мелатонинова апликация – докато при sEPCR (фигура 17) бе наблюдавано понижаване, тромбомодулинът (фигура 18) повиши своята концентрация.

### 2.3. ЕФЕКТИ НА МЕЛАТОНИНА И ЛУЗИНДОЛА ВЪРХУ АНТИГЕННОТО НИВОТО НА СВОБОДНИЯ ПРОТЕИН S И АКТИВНОСТТА НА ПРОТЕИН S

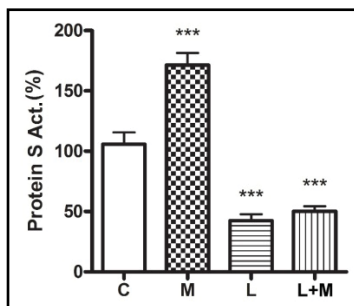
Резултатите, представени на фигура 19 показват, че триденното приложение на мелатонин повишава свободния протеин S от  $6,81 \pm 0,53$   $\mu$ g/ml (контролна група) до  $9,77 \pm 0,68$   $\mu$ g/ml ( $p < 0.01$ ). Лузиндолът намалява нивото на свободния протеин S до  $3,02 \pm 0,39$   $\mu$ g/ml ( $p < 0.001$ ). Претрети-

рането с лузиндол повтаря този ефект, като понижението на свободния протеин S е до  $3,65 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ ).



**Фиг. 19.** Динамика на плазменото ниво на свободния PS (free PS:Ag) у мъжки Wistar плъхове, третирани s.c. с мелатонин ( $0,2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), лузиндол ( $0,4 \text{ mg/kg b.w.}$ ) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

Данните са представени като  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



**Фиг. 20.** Плазмена Protein S: Act. у мъжки плъхове порода Wistar, третирани s.c. с мелатонин ( $0,2 \text{ mg/kg b.w.}$ ), лузиндол ( $0,4 \text{ mg/kg b.w.}$ ) и мелатонин 1 час след претретиране с лузиндол (в същите дози), 2 пъти дневно, в три последователни дни. Използвани съкращения: C – контролна група, инжектирана с физиологичен разтвор; M - мелатонин; L - лузиндол.

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

На фигура 20 са отразени промените в активността на протеин S (%). Триденното приложение на мелатонин повишава активността на протеин S до  $171,50 \pm 9,92$  ( $p < 0.001$ ). Лузиндолът и претретирането с него намаляват активността на протеин S съответно до  $42,33 \pm 5,44$  ( $p < 0.001$ ) и  $50,31 \pm 4,16$  ( $p < 0.001$ ). Стойността на активността на протеин S при контролната група животни беше  $105,80 \pm 9,73$ .

Важно условие за реализиране на антикоагулационната активност на APC се явява свързването му с негови кофактори като протеин S, отрицателно заредени фосфолипидни мембрани, липопротеини с висока плътност (S.M.Rezende et al., 2004; L. Mosnier et al., 2006). Протеин S функционира като кофактор на APC-зависимо протеолитично инактивиране на коагулационните фактори Va и VIIIa (A.C.Rigby, M.A. Grant, 2004). Протеин S съществува под две форми – свободна и свързана. Само свободният протеин S има кофакторна активност по отношение на APC (E. Castoldi, T.M. Hackeng, 2008). След апликация на мелатонин се установи сигнификантно повишаване на свободния протеин S (фигура 19), както и на активността на протеин S (фигура 20). Тези промени би могло да са израз на стимулирана биосинтеза на протеин S в хепатоцитите след третирането с мелатонин (R. Kegg, 2003).

Приложението на неселективния антагонист на мелатонина – лузиндол, самостоятелно и при претретиране изцяло премахва ефекта на мелатонина и понижава както свободния протеин S (фигура 19), така и активността на протеин S (фигура 20). Анализът на тези данни насочва към участие на MT1/MT2 рецептори при опосредстване действието на мелатонина върху изследваните показатели, ефект, който се блокира от лузиндола.

### 3. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

При обобщаването на резултатите от проучването на ефектите на мелатонина върху хемостазата у плъхове е необходимо да се подчертае, че изследването е проведено върху здрави, интактни мъжки плъхове по рода Wistar. Използваните дози са близки до физиологичните за разлика от по-високите дози, прилагани от други автори в експериментални и клинични проучвания (P.H. Wirtz, C. Bärtschi et al., 2008; P.H. Wirtz, M.Spillmann et al., 2008; K. S. Girish et al., 2013)

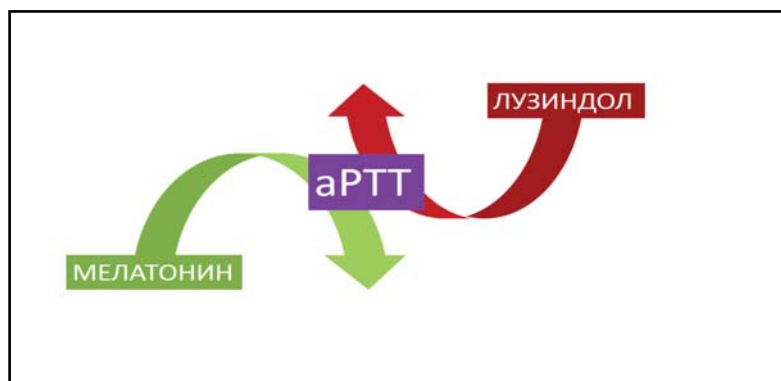
При реализирането на първата поставена задача – изследване влиянието на мелатонина и лизиндола върху коагулационната система, беше проучен ефектът на хормона и неговия инхибитор, върху две групи плазмени фактори: групата на коагулационни фактори ФV, ФXI, ФXII, ФXIII и един от скриниращите показатели – aPTT и групата на витамини K-зависимите плазмени протеини.

Тридневното третиране на плъховете с мелатонин (фигура 1) предизвика скъсяване на aPTT. Тази промяна е показателна за хиперкоагулабилитет и е илюстрация за активиране на хемокоагулацията по вътрешната система за образуване на протромбинов активатор (R. W.Colman et al., 2006). Интерес представляват ефектите на мелатонина върху коагулационните фактори ФV, ФXI, ФXII, ФXIII (фигури 2-5). Плазмен фактор XII играе ключова роля в иницирането на вътрешната система за образуване на протромбинов активатор (T.Renné, D.Gailani, 2007), фактор V е кофактор на протромбиновия комплекс (K. Segers et al., 2007), докато активираната форма на плазмен фактор XIII катализира образуването на ковалентни връзки между гама- и алфа-веригите на фибрина, като повишава механичната стабилност и резистентност на фибриновия съсирек (V. G.Nielsen et al., 2004; M.Cushman et al., 2009). Под влияние на мелатонина се повиши активността на коагулационните фактори ФV, ФXII и ФXIII (фигури 2,

4, 5), докато активността на ФХІ (фигура 3) почти не се промени. Трите изследвани плазмени фактори на съсирването - ФV, ФХІ и ФХІІ са част от факторите, чиито функции се оценяват чрез аРТТ - един интегрален показател на коагулацията. Установените промени в аРТТ са в съответствие с наблюдаваната повишена активност на плазмените фактори на коагулацията ФV, ФХІІ и ФХІІІ под влияние на мелатонина и свидетелстват за повлияване на хемокоагулацията в посока на хиперкоагулабилитет.

Самостоятелното приложение на мелатониновия антагонист лузиндол предизвика супресиращ ефект върху активността на фактори ФV, ФХІ, ФХІІ, ФХІІІ (фигури 2-5), което е в съответствие с наблюдаваното удължаване на аРТТ (фигура 1) и е доказателство за участието на МТ1 и МТ2 при осъществяване на мелатониновите ефекти върху хемокоагулацията. Претретирането с лузиндол не само наподобява ефектите от самостоятелната апликация, но напълно премахва стимулиращия ефект на екзогенния мелатонин върху изследваните плазмени фактори.

Обобщените ефекти на мелатонина и лузиндола върху аРТТ са представени на фигура 21.

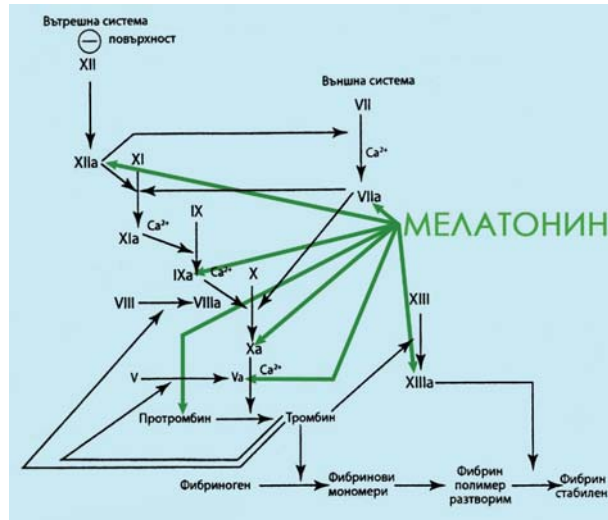


**Фиг. 21.** Ефекти на мелатонина и лузиндола върху аРТТ. Червената стрелка илюстрира удължаване, а зелената – скъсяване на аРТТ.

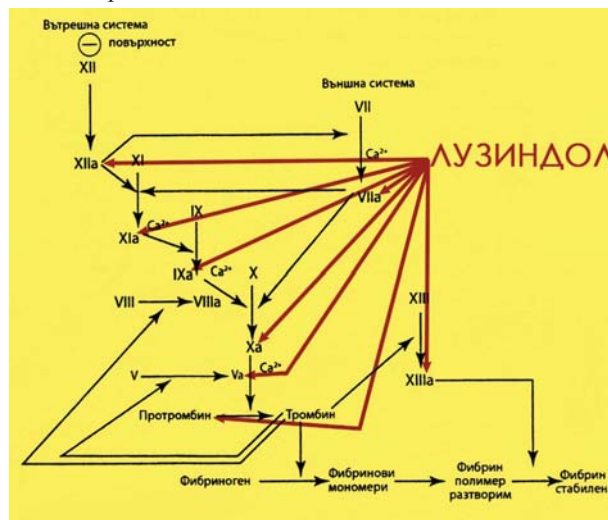
Ефектите на мелатонина и неговия антагонист бяха изследвани върху втора група коагулационни фактори, а именно витамин К-зависимите плазмени протеини. Обособяването им е продиктувано от особеното място, което заемат в коагулационната каскада, а именно участие във вътрешната и външната системи и общия краен път на образуване на протромбинов активатор (S. Gallistl et al., 2002; S.E. Lind et al., 2003; R.W. Colman et al., 2006). Паралелно бяха проучени промените в антигенната концентрация и активността на фактори II, VII, IX и X под влияние на мелатонина и лузиндола. Анализът на данните, представени на фигури 6-13, илюстрира значими и еднопосочни промени, а именно: повишение както на плазмената концентрация, така и на активността на изследваните фактори. Подробният анализ на ефекта на мелатонина установява разлики в силата на въздействието на мелатонина, като плазменото ниво на ФII (фигура 6) е повишено в по-голяма степен и активността на ФX (фигура 13) е по-силно повлияна. Специфично е влиянието на лузиндола – той потиска както синтеза и секрецията на витамин К-зависимите коагулационни фактори от хепатоцитите (фигури 6-9), така и активността на тези фактори (фигури 10-13). Претретирането с лузиндол напълно възпроизвежда резултата от експерименталните данни при самостоятелното приложение на мелатониновия антагонист върху витамин К-зависимите плазмени фактори (фигури 6-13).

Обобщените ефекти на мелатонина и лузиндола върху плазмените фактори на коагулационната система са представени на фигури 22-24.

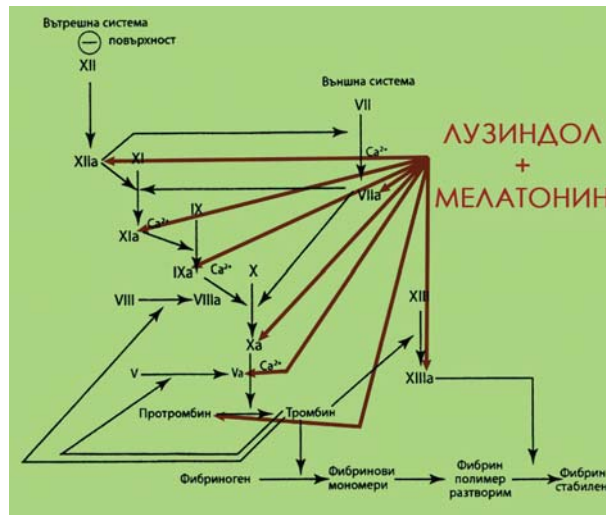




**Фиг. 22.** Ефекти на мелатонина върху показатели на коагулационната система. Зелена стрелка – повишена активност на посочените фактори.



**Фиг. 23.** Ефекти на лузиндола върху показатели на коагулационната система. Червена стрелка – намалена активност на посочените фактори.



**Фиг. 24.** Ефекти на мелатонина 1 час след претретиране с лузиндол върху показатели на коагулационната система. Червена стрелка – намалена активност на посочените фактори.

Втората поставена задача включваше проучване ефектите на мелатонина и лузиндола върху протеин С-антикоагулационната система, като част от антикоагулационните механизми. Системата на протеин С ангажира редица мембраносвързани и циркулиращи протеини: протеин С, тромбомодулин, sEPCR и протеин S (F.J. Castellino et al., 2009). Паралелно бяха проучени промените в антигенната концентрация (фигура 14) и активността (фигура 15) на протеин С, както и плазмената концентрация на активирания протеин С (фигура 16) и (таблица 4). Въпреки че, концентрацията и активността на протеин С и активирания протеин С са показатели, имащи отношение не само към синтезата и секрецията, но и към етапите на активиране на протеин С, наблюдаваните от нас промени в трите параметъра под влияние на мелатонина са в посока на понижение и свидетелстват за потискане активността на протеин С-антикоагулационната система и проява на тенденция към хиперкоагулабилитет.

ЕРСР е белтъчен рецептор за зимогена и активираните форми на плазмения протеин С (E.M. Gleeson et al., 2012). При протеолитично разцепване на мембранносвързаната форма възниква разтворимата форма sЕРСР, която може да инхибира активирания протеин С (E. Ducros et al., 2012). Триденното приложение на мелатонин на плъхове предизвика повишение на sЕРСР (фигура 17), резултат който корелира с наблюдаваното от нас понижаване на активирания протеин С (фигура 16). Нашите резултати за повишение на sЕРСР под влияние на мелатонина са в съответствие с данните, че повишените нива на sЕРСР са индикатор за риска от тромбоза и биомаркер на хиперкоагулация (E. Ducros et al., 2012).

Друг трансмембранен ендотелен рецептор, въввлечен в протеин С-антикоагулационната система е тромбомодулинът, важен кофактор на тромбин-медираната активация на протеин С (M. Van de Wouwer et al., 2004; E. Biguzzi et al., 2007). Триденното прилагане на мелатонин в нашето изследване предизвика намаляване на тромбомодулина (фигура 18), резултат който корелира с установените промени в нивото на РС:Ag, РС:Act и активирания РС и е в посока потискане активността на протеин С-антикоагулационната система и е проява на тенденция към хиперкоагулабилитет.

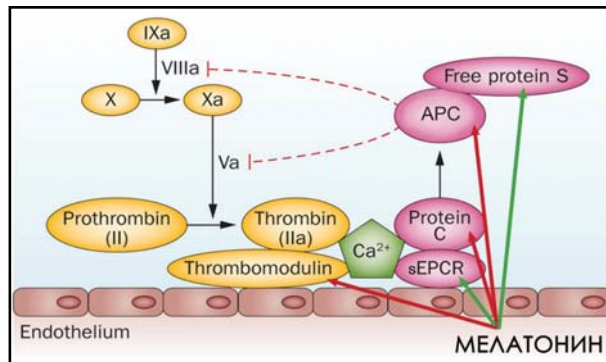
Активираният протеин С съвместно с неговия кофактор протеин S инхибира коагулацията чрез необратимо протеолитично инактивиране на FVa и FVIIIa на повърхността на отрицателно заредени фосфолипидни мембрани (E. Castoldi, T.M. Hackeng, 2008). След триденна апликация на мелатонин у плъхове се установи повишаване както на свободния протеин S (фигура 19), така и на активността на протеин S (фигура 20).

След приложение на лизиндол, както и при претретиране с него, промените при всички показатели са в противоположна посока на промените при същите показатели след прилагането на мелатонин. На фигури 14-16 е видно повишението на антигенната концентрация и активност на про-

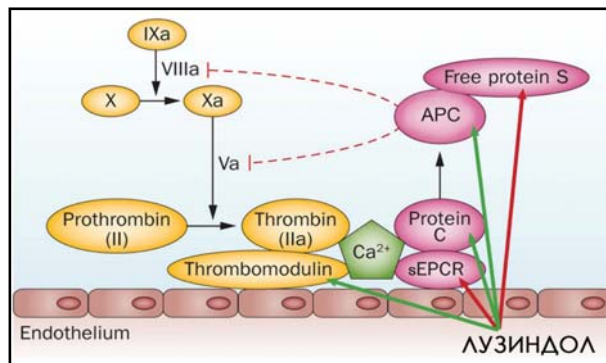
теин С и на активирания протеин С. Подобен ефект се наблюдава и по отношение нивото на тромбомодулина (фигура 18) – лузиндолът повишава и неговото ниво. Така представеното стимулиране на тези ключови елементи на протеин С-антикоагулационната система е в съответствие с потиснатото ниво на sEPCR (фигура 17) под влияние на лузиндола. Неселективният рецепторен антагонист на мелатонина предизвиква намаляване както на свободния протеин S (фигура 19), така и на активността на протеин S (фигура 20). Анализът на промените в елементите на протеин С-антикоагулационната система под влияние на лузиндола позволява те да се тълкуват като доказателство за участието на MT1/MT2 рецепторите при опосредстване ефектите на мелатонина върху коагулацията. Представените резултати сочат, че претретирането с лузиндол ефективно премахва наблюдаваните ефекти след апликация на мелатонин. Освен това третирането с мелатонин след претретиране с лузиндол почти изцяло повтаря промените при изследваните показатели, получени след самостоятелното приложение на лузиндол. Този факт ни дава право да приемем, че лузиндолът сменя ефекта на екзогенния мелатонин. Особено внимание заслужават резултатите получени при следните показатели: sEPCR (фигура 17), нивото на свободния протеин S (фигура 19) и активността на протеин S (фигура 20). Наблюдаваните стойности след самостоятелното приложение на лузиндол, както и при претретиране с него, са по ниски от тези на контролната група животни – факт, който ни дава право да допуснем, че неселективният антагонист на MT1 и MT2 рецепторите в значителна степен блокира и ендогенния мелатонин. На базата на така описаните резултати бихме могли да предположим значително по-сложно участие на MT1 и MT2 рецептори при реализиране ефектите на мелатонина върху протеин С-антикоагулационната система у плъхове. Представените промени в показателите на протеин С-антикоагулационната система, като част от антикоагулационните механизми, илюстрират потискането ѝ, което кор-

лира с установената тенденция към хиперкоагулабилитет.

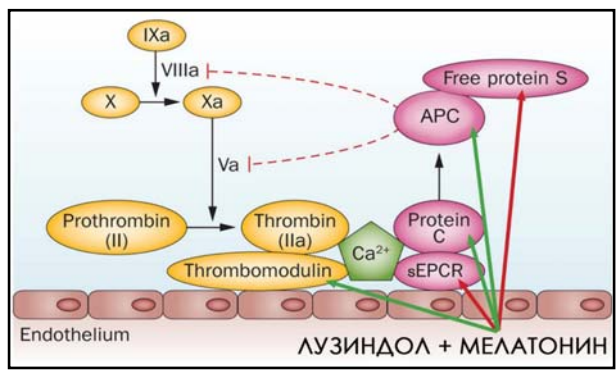
Обобщените ефекти на мелатонина и лузиндола върху протеин С-антикоагулационната система са представени на фигури 25-27.



**Фиг. 25.** Ефекти на мелатонина върху протеин С-антикоагулационната система. Зелена стрелка – повишено плазмено ниво, червена стрелка – намалено плазмено ниво. Използвани съкращения: sEPCR – разтворим ендотелен протеин С рецептор; APC – активиран протеин С.



**Фиг. 26.** Ефекти на лузиндола върху протеин С-антикоагулационната система. Зелена стрелка – повишено плазмено ниво, червена стрелка – намалено плазмено ниво. Използвани съкращения: sEPCR – разтворим ендотелен протеин С рецептор; APC – активиран протеин С.



**Фиг. 27.** Ефекти на мелатонина 1 час след претретиране с лузиндол върху протеин С-антикоагулационната система. Зелена стрелка – повишено плазмено ниво, червена стрелка – намалено плазмено ниво. Използвани съкращения: sEPCR – разтворим ендотелен протеин С рецептор; APC – активиран протеин С.

## ИЗВОДИ

1. Хормонът на епифизата – мелатонин, приложен в три последователни дни на интактни мъжки плъхове порода Wistar, предизвиква хиперкоагулабилитет видно от:
  - значимо скъсеното активирано парциално тромбoplastиново време;
  - значимо повишената активност на коагулационни фактори V, XII и XIII;
  - значимо повишената плазмена концентрация и активност на витамин К-зависимите плазмени коагулационни фактори – II, VII, IX и X;
  - силно редуцираната активност на протеин С-антикоагулационната система (намалява плазменото ниво и активност на протеин С, намалява плазменото ниво на активирания протеин С, на тромбомодулин и нараства концентрацията на sEPCR).
2. Самостоятелното приложение в три последователни дни на неселективния антагонист на мелатониновите рецептори – лузиндол, води до хипокоагулабилитет като предизвиква:
  - потискане на активността на коагулационни фактори V, XI, XII и XIII;
  - намаляване на плазмената концентрация и активност на витамин К-зависимите плазмени фактори - II, VII, IX и X;
  - активиране на протеин С-антикоагулационната система чрез специфично повлияване на неговите компоненти (повишава плазменото ниво и активността на протеин С, повишава плазменото ниво на активирания протеин С, на тромбомодулин и намалява sEPCR);
  - лузиндолът блокира ефектите както на ендогенния, така и на екзогенния мелатонин върху коагулацията.
3. Третирането на мъжки плъхове с мелатонин един час след претретиране с лузиндол повтаря ефектите, наблюдавани след самостоятелното приложение на лузиндол, като предизвиква хипокоагулабилитет.

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

Получените резултати имат оригинален характер.

1. Проведено е първо по рода си проучване на влиянието на мелатонина, приложен в ниски фармакологични дози на интактни плъхове, върху 20 показатели на коагулационната и антикоагулационна системи, което прави възможно да се прецизират както мястото на действие на хормона, така и на част от механизмите на неговите хемостазни ефекти.
2. Установено е, че мелатонинът активира вътрешния, външния и общия краен път на хемокоагулацията.
3. Установено е, че мелатонинът поражда тенденция към хиперкоагулабилитет и като потиска активността на един от основните елементи на антикоагулационните механизми – протеин С-антикоагулационната система.
4. Показано е, че неселективният антагонист на мелатонина – лузиндол има противоположни на мелатонина ефекти както върху коагулационната, така и върху антикоагулационната системи, което е и своеобразно доказателство за ролята на MT1 и MT2 рецептори.
5. Установено е, че лузиндолът блокира ефекта на приложения след него мелатонин върху коагулационната и антикоагулационна системи и по своята същност предизвиква ефекти, наблюдавани след неговото самостоятелно прилагане, т.е. хипокоагулабилитет.
6. Показано е експериментално, че мелатонинът неоспоримо повлиява хемокоагулацията в посока на хиперкоагулабилитет. Като се има предвид, че в клиничната практика мелатонинът се използва все по-широко като лекарствено средство или хранителна добавка, в дози по-високи от експерименталните, има основание да се допусне при тези пациенти необходимостта от лабораторен контрол на хемостазата.



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

### ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. Nyagolov Y., **Stancheva E.**, Decheva L., Pashalieva I., Negrev N. Melatonin and luzindole effects on the activity of plasma clotting factors V, XI, XII and XIII in the rat. Comptes rendus de l'Academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките), 2012; 65(8): 1151-1156.  
**IF=0,219**
2. **Stancheva E.**, Negrev N., Nyagolov Y., Pashalieva I., Decheva L. Melatonin – a regulator of vitamin K-dependent blood coagulation factors, plasma levels and activities. Comptes rendus de l'Academie bulgare des sciences (Доклади на Българската академия на науките), 2015; 68(3):383-390.  
**IF=0,219**
3. **Stancheva E.**, Zarkova A., Pashalieva I., Nyagolov Y., Negrev N. Melatonin inhibits the protein C- anticoagulant pathway in rats. Scripta Scientifica Medica, 2015; 47(1): 57-63.

### ПУБЛИКУВАНИ РЕЗИОМЕТА НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Pashalieva I., Decheva L., **Stancheva E.**, Nyagolov Y., Negrev N. Screening study of melatonin effects on basic integral parameters of blood coagulation (PT, aPTT, TT, ECLT). FEPS physiology congress, Istanbul, Turkey, September 3-7, 2011. Acta Physiologica 2011, vol. 203, Suppl. 686:177.
2. **Stancheva E.**, Decheva L., Pashalieva I., Nyagolov Y., Negrev N.. Melatonin- and luzindole – induced effects on the activity of V, XI, XII and XIII plasma coagulation factors. X национален конгрес на българското дружество по физиологични науки, Варна, 9-11 октомври 2011, Scripta Scientifica Medica. 2011;43(3):236.