

УДК 616.61:616.379-008.64:612.084

DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4681635>

**ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ СУДИННО-ТРОМБОЦИТАРНОГО
ГЕМОСТАЗУ ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ ТА
ДІАБЕТИЧНІЙ НЕФРОПАТІЇ У ЩУРІВ**

Савицький І.В., Грицан І.І.

Одеський міжнародний медичний університет

**ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ СОСУДИСТО-
ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ
РЕТИНОПАТИИ И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС**

Савицкий И.В., Грицан И.И.

Одесский международный медицинский университет

**PECULIARITIES OF THE CONDITION OF VASCULAR PLATELETIC
HEMOSTASIS IN DIABETIC RETINOPATHY AND DIABETIC
NEPHROPATHY IN RATS**

Savitsky I.V., Gritsan I.I.

Odessa International Medical University

70

Summary/Резюме

The article presents experimental data of the study of changes in vascular-platelet hemostasis in rats with experimental diabetic retinopathy DR and diabetic nephropathy DN on the background of type 2 diabetes. It is established that microcirculatory complications of type 2 diabetes are characterized by a decrease in platelet count, increased aggregation capacity. In the study of induced platelet aggregation, the polarity of the results of the study was proved, which indicates the dependence of the complication on the functional state of vascular platelet hemostasis, primarily due to stimulated, depleted platelets and the corresponding number of intact platelets. More pronounced changes in vascular-platelet hemostasis on the background of type 2 diabetes in rats with DN compared with the group of animals that reproduced DR.

Key words: *diabetes mellitus, microangiopathy, vascular-platelet hemostasis, platelet aggregation.*

В статті наведено експериментальні дані щодо вивчення змін показників судинно-тромбоцитарного гемостазу у щурів з експериментальною діабетичною ретинопатією (ДР) та діабетичною нефропатією (ДН) на тлі цукрового діабету (ЦД) 2 типу. Встановлено, що мікроциркуляторні ускладнення ЦД 2 типу характеризуються зниженням кількості тромбоцитів, підвищення агрегаційної здатності. При дослідженні індукованої агрегації тромбоцитів доведена полярність результатів дослідження, що вказує на залежність ускладнення від функціонального стану судин-

но-тромбоцитарного гемостаза, насамперед, за рахунок стимульованих, спустошених тромбоцитів та відповідної кількості інтактних кров'яних пластинок. Більш виражені зміни судинно-тромбоцитарного гемостаза на тлі ЦД 2 типу у щурів з ДН порівняно із групою тварин, яким відтворювали ДР.

Ключові слова: цукровий діабет, мікроангіопатії, судинно-тромбоцитарний гемостаз, агрегація тромбоцитів.

В статье приведены экспериментальные данные по изучению изменений показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у крыс с экспериментальной диабетической ретинопатией (ДР), диабетической нефропатией (ДН) на фоне сахарного диабета (СД) 2 типа. Установлено, что микроциркуляторные осложнения СД 2 типа характеризуются снижением количества тромбоцитов, повышением агрегационной способности. При исследовании индуцированной агрегации тромбоцитов доказана полярность результатов исследования, которая указывает на зависимость осложнения от функционального состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, прежде всего, за счет стимулированных, опустошенных тромбоцитов и соответствующего количества интактных кровяных пластинок. Более выраженные изменения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза на фоне СД 2 типа наблюдаются у крыс с ДН по сравнению с группой животных, у которых моделировали ДР.

Ключевые слова: сахарный диабет, микроангиопатии, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, агрегация тромбоцитов.

Вступ

Однією з глобальних проблем сучасної медицини є цукровий діабет (ЦД), й передусім, ЦД 2 типу, який складає близько 90 % усіх випадків захворювання та має пандемічний характер розповсюдження в усьому світі [12]. Згідно з даними Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) у 2017 році було зареєстровано 425 млн. хворих на ЦД та 352 млн. людей з порушеною толерантністю до глюкози, які мають високий ризик розвитку діабету. У 2045 р. очікується збільшення кількості хворих на ЦД до 629 млн. [11]. В Україні за даними Центру медичної статистики МОЗ України кількість зареєстрованих хворих на діабет перевищує 1,8 млн. осіб, серед яких переважає ЦД 2 типу (90%) [10].

Процес зсідання крові забезпечується 3 основними компонентами: тромбоцитів, факторів коагуляції та цілісністю судинної стінки. Якщо хоча б

один із компонентів пошкоджується, то активується процес, який призводить до тромбоутворення. Численні дослідження довели, що при ЦД обох типів відмічається пошкодження всіх складових системи гемостаза, необхідних для збереження нормального зсідання крові. Система гемостаза при ЦД вивчається вже понад 20 років. Встановлено, що ЦД є протромботичним станом, який пов'язаний з високим ризиком розвитку ускладнень мікро- та макроциркуляторного русла [8].

На сьогодні деякі ланки патогенезу ускладнень мікроциркуляторного русла (діабетична ретинопатія (ДР), діабетична нефропатія (ДН)), на долю яких припадає «левова частка» всіх ускладнень ЦД, залишаються нез'ясованими, але вважається, що механізм їх розвитку складається з двох взаємопов'язаних патофізіологічних процесів: структурних і функціональних порушень стінки мікросудин, порушень судинно-тромбоцитарної та гуморальної ланок

гемостазу [8, 9].

Мета дослідження – вивчити особливості змін судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу у щурів з ускладненнями мікроциркуляторного русла на тлі ЦД 2 типу.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження виконані на 18 білих нелінійних щурах-самцях масою 250-300 г, які були розподілені на 3 експериментальні групи: 1 група – інтактний контроль – здорові тварини, що утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію; 2 група – контрольна патологія – тварини, яким після уведення STZ та нікотинамідом відтворювали модель ДР; 3 група – тварини, яким після уведення STZ та нікотинамідом відтворювали модель ДН [4].

Для відтворення ЦД 2 типу використовували стрептозотоцинову модель. З цією метою щурам одноразово внутрішньовенно вводили стрептозотоцину («SigmaAldrich Chemie GmbH», Німеччина) дозою 65 мг/кг [4]. Розчин STZ готували в 0,1 М цитратному буфері рН 4,5. З метою зниження діабетогенної дії STZ за 15 хвилин до його введення, внутрішньоочеревинно вводили нікотинамід (Afton Pharma, Індія) дозою 230 мг/кг, який дозволяє зберегти до 40 % запасів панкреатичного інсуліну у дослідних щурів, за рахунок чого, на відміну від інших стрептозотоцинових моделей, у тварин розвивається помірна та стабільна базальна гіперглікемія. Дана модель дозволяє відтворити головні патогенетичні ознаки ЦД 2 типу у людини, а саме – порушення секреції та дії інсуліну та характеризується розвитком інтолерантності до вуглеводів, відносною недостатністю секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози та збереженням секреторної реакції на неглюкозні секретогени (в тому числі на сульфані-

ламідні препарати) [3, 4].

Через 1 тиждень проводили глюкозолерантний тест для визначення рівня глікемії натще та через 30, 60, 90 та 120 хв після внутрішньошлункового введення 40 % розчину глюкози дозою 3 г/кг та рівні глікемії від 9,0 до 14 ммоль/л.

З метою відтворення ДР вводили підшкірно розчин еритропоетину 3 на тиждень по 6 Од на 100 г маси тіла протягом 6 місяців. Вибір даної моделі базувався на даних авторів, в працях яких було доведено, що еритропоетин є індуктором ангиогенезу та тим самим є ключовою ланку в протіканні ДР [3].

Для відтворення ДН раціон експериментальних щурів базувався на високожировому харчуванні. На 35-40 тиждень у тварин відзначали ознаки ДН – протеїнурію, зниження швидкості клубочкової фільтрації [1].

Для оцінки стану судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу було обрано наступні показники: кількість тромбоцитів (г/л), ступінь агрегації тромбоцитів з ристоміцином (%), ступінь агрегації тромбоцитів з адреналіном (%), швидкість агрегації тромбоцитів за 30 с (%/хв), час агрегації тромбоцитів (хв).

Підрахунок кількості тромбоцитів проводили за методом Фоніо в мазках крові із застосуванням мікроскопу Carson Advanced 400-1600x (США) [2]. Агрегацію тромбоцитів оцінювали за експрес-методом візуальної оцінки А. С. Шитікова (2008) [2]. Індуковану агрегацію тромбоцитів вивчали за методом С. Б. Павлова (2017) [6].

При роботі з тваринами дотримувалися Міжнародного кодексу медичної етики (Венеція, 1983), «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на

тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council on the protection of animals used for scientific purposes, закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р. [7]

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 8.0». Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Стьюдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при $p < 0,05$ [5].

Результати та їх обговорення

Рівень глюкози в крові щурів 2 та 3 експериментальних груп на 3-у добу після введення STZ достовірно перевищував в 4,2 рази аналогічний показник інтактних тварин. Розвиток ЦД 2 типу супроводжувався полідипсією, поліурією, тварини були в'ялі та апатичні.

Досліджено, що кількість тромбоцитів у групі тварин, яким відтворювали ускладнення мікроциркуляторного русла на фоні ЦД 2 типу було достовірно нижчою, аніж в контрольній групі ($p < 0,05$), особливо в групі щурів, яким відтворювали ДН (табл. 1).

Можна припустити, що дане зниження пов'язане з недостатньою продукцією тромбопоетину або з елімінацією із кровотоку великої кількості незворотноактивованих тромбоцитів. Відомо, що гіперглікемія викликає глікозилювання білкових компонентів

клітинних мембран, зокрема тромбоцитів, що призводить до зниження їх кількості за рахунок скорочення тривалості життя.

При дослідженні швидкості агрегації тромбоцитів за 30 секунд встановлено, що в групі щурів, яким відтворювали ДН, даний показник підвищувався в 1,4 рази ($p < 0,05$), а в групі тварин з ДР – в 1,3 рази ($p < 0,05$). Час агрегації тромбоцитів у групі тварин з ДН підвищувався в 1,3 рази ($p < 0,05$), у щурів з ДР – в 1,2 рази ($p < 0,05$).

Одержані результати вказують на гемостатичні зсуви судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу, насамперед за рахунок підвищення агрегаційної здатності кров'яних пластинок. Даний механізм обумовлений умовами підвищеного рівня глюкози в крові, в тому числі і за рахунок осмотичної дії, в результаті яких відбувається глікозилювання поверхневих білків тромбоцитів з наступним підвищенням концентрації медіаторів, стимулюючих їх активацію, що призводить до зміни структури кров'яних пластинок та підвищенню їх агрегаційних властивостей [8].

Результати дослідження ступеня агрегації тромбоцитів під впливом індукторів агрегації (ристоміцину/ адреналіну) у щурів з експериментальною ДН та ДР представлені в рис. 1.

Встановлено, що показник агрегації тромбоцитів з ристоміцином був однаково достовірно підвищений як у групі тварин з експериментальною ДН, так із ДР, в той час як адреналініндукована агрегація була

достовірно зниженою в обох групах тварин. Полярність результатів дослідження залежить від функціонального стану судинно-тромбоцитарного гемос-

Показники, що характеризують судинно-тромбоцитарний гемостаз у щурів з експериментальною діабетичною нефропатією та діабетичною ретинопатією ($\bar{X} \pm Sx$, $n = 6$)

Показник	Інтактна група	Тварини з експериментальною ДН	Тварини з експериментальною ДР
Кількість тромбоцитів, г/л	532,0 ± 11,0	397,6 ± 14,2*	424,6 ± 17,4*
Швидкість агрегації тромбоцитів за 30 с, %/хв	10,3 ± 1,1	14,7 ± 0,9*	13,4 ± 1,0*
Час агрегації тромбоцитів, хв	12,3 ± 1,3	15,5 ± 1,1*	14,7 ± 1,2*

Примітка: $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин.

тазу, насамперед, за рахунок стимульованих, спустошених тромбоцитів та відповідної кількості інтактних кров'яних пластинок. У відповідь на додавання агоністів стимульовані клітини можуть не реагувати, а інтактні клітини активуються, що і створює «яскраву» різнобічність показників.

Висновки

1. У щурів з ДН на тлі ЦД 2 типу відмічали достовірні зміни показників судинно-тромбоцитарного гемостазу, зокрема зниження кількості тромбоцитів та підвищення часу агрегації тромбоцитів.
2. При дослідженні індукованої агрегації тромбоцитів встановлено полярність результатів дослідження, що вказує на залежність ускладнення від функціонального стану судинно-тромбоцитарного гемостазу, насамперед, за рахунок стимульованих, спустошених тромбоцитів та відповідної кількості інтактних кров'яних пластинок.
3. Встановлено, що зміни судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу на тлі ЦД 2 типу більш виражені у щурів з ДН порівняно із групою тварин, яким відтворювали ДР.

Література

1. Байрашева В. К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте. Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>
2. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушенной гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 292 с.
3. Диагностика метаболического синдрома: терапевтическое руководство*. Репродуктивная эндокринология. 2012. № 6 (8). С. 53–55.

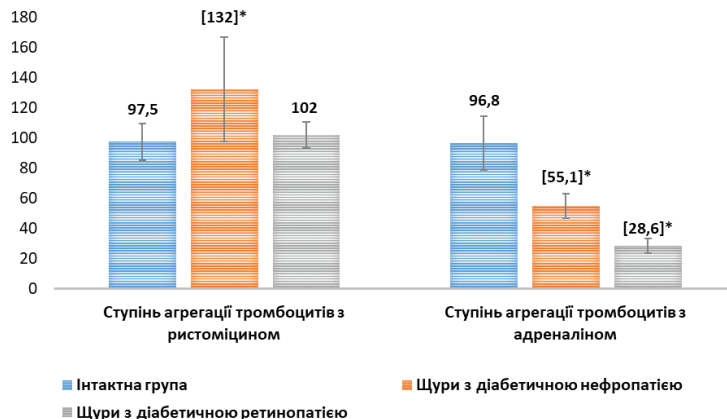


Рис. 1. Агрегація тромбоцитів при додаванні індукторів агрегації у щурів з мікроциркуляторними ускладненнями на фоні ЦД 2 типу ($X \pm S_x$, $n=6$)
 Примітка: $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О. В. Стефанова. К. : Авіценна, 2001. 528 с.
5. Методы статистической обработки медицинских данных : метод. рек. / А. Г. Кочетов, О. В. Лянг, И. В. Жиров и др. М.: РКНПК, 2012. – 42 с.
6. Павлов С. Б. Механізми участі фізіологічної системи сполучної тканини у формуванні патологічних процесів : дис. ... доктора мед. наук : 14.03.04 / Сергій Борисович Павлов. Суми, 2017. 394 с.
7. Резніков О. Г., Соловйов А. І., Стефанов О. В. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації. Вісник фармакології і фармації. 2006. № 7. С. 47–61.
8. Северина А. С., Шестакова М. В. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом. Сахарный диабет. 2004. № 1. С.62–67.
9. Сибирева О. Ф., Уразова О. И., Калюжин В. В. Показатели тромбоцитарного гемостаза и дисфункции эндотелия у пациентов с сахарным диабетом с диабетической нефропатией. Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можая. 2012. № 1 (13). С. 39–43.
10. Цитовський М. Н. Статистичний, клінічний та морфологічний аспекти впливу цукрового діабету на стан серцево-судинної системи. Науковий вісник Ужгородського університету. 2017. Т. 55,

Вип. 1. С. 168–177.

11. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 / N. H. Cho et al. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018. Vol. 138. P. 271–281.
 12. World Health Organization. Global report on diabetes 2016. 88 p. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants / Z. A. Abdeen et al. *Lancet.* 2016. Vol. 387, № 10027. P. 1513–1530.
- References**
1. Bayrasheva VK Modeling of diabetes mellitus and diabetic nephropathy in experiment. *Modern problems of science and education.* 2015. No. 4. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>
 2. Barkagan ZS, Momot AP Diagnostics and controlled therapy of hemostasis disorders. М.: Nyudiamed, 2008. 292 p.
 3. Diagnosis of metabolic syndrome: a therapeutic guide *. *Reproductive endocrinology.* 2012. No. 6 (8). S. 53–55.
 4. *Doklinichni doslizhennya lykarskih zasobiv: method. rivers.* / ed. Corresponding Member NAMS of Ukraine, acad. O. V. Stefanyuk. K.: Avicenna, 2001. 528 p.
 5. *Methods of statistical processing of medical data: method. rivers.* / A. G. Kochetov, O. V. Lyang, I. V. Zhironov et al. М.: RKNPK, 2012. — 42 p.
 6. Pavlov SB Mechanisms of the participation of physiological systems and the resulting tissue in the formation of pathological processes: dis. ... doctor honey. *Sciences: 14.03.04 / Sergiy Borisovich Pavlov. Sumi,* 2017. 394 p.
 7. Reznikov O. G., Solovyov A. I., Stefanov O. V. Biotic examination of reports and scientific reports, how to win on creatures: method. recommendations. *Bulletin of Pharmacology and Pharmacy.* 2006. No. 7. P. 47–61.
 8. Severina AS, Shestakova MV Violation of the hemostasis system in patients with diabetes mellitus. *Diabetes.* 2004. No. 1. P. 62–67.
 9. Sibireva OF, Urazova OI, Kalyuzhin VV Indicators of platelet hemostasis and endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus with diabetic nephropathy. *Ukrainian Journal of Extremal Medicine imeni G. O. Mozhava.* 2012. No. 1 (13). S. 39–43.
 10. Tsitovskiy MN Statistical, clinical and morphological aspects of the infusion of red diabetes on the camp of the heart-vascular system. *Scientific list of Uzhgorod University.* 2017. Vol. 55, Vip. 1. P. 168–177.
 11. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 / N. H. Cho et al. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018. Vol. 138. P. 271–281.
 12. World Health Organization. Global report on diabetes 2016. 88 p. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants / Z. A. Abdeen et al. *Lancet.* 2016. Vol. 387, No. 10027. P. 1513–1530.

*Впервые поступила в редакцию 22.09.2020 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*