

УДК 616.151.5/.153-06:616.379-008.61]-07
 DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4430740>

I. I. Грицан, Н. І. Прейс, Я. В. Сірман, І. В. Савицький, В. М. Сарахан

ПОКАЗНИКИ КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ ТА СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ ІЗ РІЗНОЮ ВИРАЖЕНІСТЮ АНГІОПАТІЙ

Одеський міжнародний медичний університет
 Одеський національний медичний університет

Summary. Hrytsan I. I., Preys N. I., Sirman, Ya.V., Savytskyi I. V., Sarakhan V. M. **INDEXES OF COAGULATION HEMOSTASIS AND SYSTEM OF FINRINOLYSIS IN TYPE II DIABETES MELLITUS WITH DIFFERENT EXPRESSIONS OF ANGIOPATHIES.** – *Odessa International Medical University; Odessa National Medical University; e-mail: badiuk_ns@ukr.net.* The rising burden of type 2 diabetes is a major concern in healthcare worldwide. This research aimed to analyze the indexes of coagulation hemostasis and system of fibrinolysis in type II diabetes mellitus with diabetic retinopathy and diabetic nephropathy on the background of experimental type 2 diabetes (ED). **Materials and methods:** Experiment was performed on 24 white nonlinear male rats weighing 240-280 g, which were divided into 4 experimental groups (6 animals each): 1 group - intact control - healthy animals kept on a standard diet of vivarium; Group 2 - animals that reproduced streptozotocin diabetes; Group 3 - control pathology - animals, which after the introduction of streptozotocin and nicotinamide reproduced ED; Group 4 - animals, which after the introduction of streptozotocin and nicotinamide reproduced ED. **Results and conclusions.** In the study of plasma hemostasis, it was found that changes in coagulation in microcirculatory lesions on the background of type 2 diabetes begin with the first link - the formation of prothrombinase. More pronounced violations in the direction of increasing the process of blood clotting were observed in the group of animals, which reproduced ED compared with the group of animals, which simulated ED. It was investigated that the activity of the fibrinolysis system was lower in rats with ED compared with the group of animals that reproduced ED and in the group of animals with type 2 diabetes.

Key words: type 2 diabetes, system of fibrinolysis, microvasculature.

Реферат. Грицан І. І., Прейс Н. І., Сірман Я. В., Савицький І. В., Сарахан В. М. **ПОКАЗАТЕЛИ КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ І СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ ПРИ САХАРНОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПА С РІЗНОЮ ВИРАЖЕНІСТЮ АНГІОПАТІЙ.** Діабет 2 типу являється серйозною проблемою здравоохоронення во всем мире. **Цель:** провести анализ показателей коагуляционного гемостаза и системы фибринолиза при сахарном диабете 2 типа с диабетической ретинопатией и диабетической нефропатией на фоне экспериментального диабета (ЭД) 2 типа. **Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 24 белых нелинейных крысах-самцах массой 240-280 г, которые были разделены на 4 экспериментальные группы (по 6 животных в каждой): 1 группа - интактный контроль - здоровые животные, находящиеся на стандартном рационе вивария; 2 группа - животные, репродуцировавшие стрептозотоциновый диабет; 3 группа - контрольная патология - животные, у которых после введения стрептозотоцина и никотинамида воспроизводилась ЭД; 4 группа - животные, у которых после введения стрептозотоцина и никотинамида воспроизводилась ЭД. **Результаты и выводы.** При исследовании плазменного гемостаза установлено, что изменения свертывания крови в очагах микроциркуляции на фоне диабета 2 типа начинаются с первого звена - образования протромбиназы.

Более выраженные нарушения в сторону увеличения процесса свертывания крови наблюдались в группе животных, воспроизводивших ЭД, по сравнению с группой животных, имитирующих ЭД. Было исследовано, что активность системы фибринолиза была ниже у крыс с ЭД по сравнению с группой животных, воспроизводивших ЭД, и в группе животных с диабетом 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, система фибринолиза, микроциркуляторное русло.

Реферат. Грицан І. І., Прейс Н. І., Сірман Я. В., Савицький І. В., Сарахан В. М. **ПОКАЗНИКИ КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ ТА СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ ІЗ РІЗНОЮ ВИРАЖЕНІСТЮ АНГІОПАТІЙ У ХХІ столітті** цукровий діабет (ЦД) все ще залишається однією із пріоритетних соціальних проблем як в Україні, так і в усьому світі. **Мета дослідження** – вивчити стан коагуляційної ланки гемостазу та системи фібринолізу при ускладненнях мікроциркуляторного русла – діабетичній ретинопатії та діабетичній нефропатії на тлі експериментального ЦД 2 типу. Експериментальні дослідження виконані на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 240-280 г, які були розподілені на 4 експериментальні групи (по 6 тварин в кожній): 1 група – інтактний контроль – здорові тварини, що утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію; 2 група – тварини, яким відтворювали стрептозотоциновий діабет; 3 група – контрольна патологія – тварини, яким після уведення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДР; 4 група – тварини, яким після уведення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДН **Висновки.** При вивченні плазмового гемостазу встановлено, що зміни коагуляції при мікроциркуляторних ураженнях на тлі ЦД 2 типу починаються вже із першої ланки – утворення протромбінази. Більш виражені порушення в бік підвищення процесу зсідання крові спостерігали у групі тварин, яким відтворювали ДН порівняно із групою тварин, яким моделювали ДР. Досліджено, що активність системи фібринолізу була нижчою у щурів з ДН порівняно із групою тварин, яким відтворювали ДР та у групі тварин з ЦД 2 типу.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, система фібринолізу, мікроциркуляторне русло.

Вступ. У ХХІ столітті цукровий діабет (ЦД) все ще залишається однією із пріоритетних соціальних проблем як в Україні, так і в усьому світі. Останніми роками його навіть стали називати неінфекційною епідемією. Згідно з оцінками експертів ВООЗ, до 2030 року загальносвітова кількість хворих на ЦД досягне 366 млн. За даними української Державної цільової Програми «Цукровий діабет» на 2017-2020 рр., реальна кількість осіб із не діагностованою патологією більша в 3-4 рази. В Україні налічується близько 2 млн. хворих на цукровий діабет та їх кількість збільшується головним чином за рахунок розвитку ЦД типу 2, на який страждає 85 - 90 % від загального числа [6, 8].

Хронічна гіперглікемія при ЦД супроводжується розвитком специфічних уражень мікроциркуляторного русла, що призводять до порушення зору, функції нирок і нервової системи [9, 10]. Ангіопатії нерідко діагностуються на пізніх стадіях ЦД 2-го типу, оскільки традиційно розглядаються як наслідок тривалої декомпенсації вуглеводного обміну. Тим часом клінічний досвід і дані літератури свідчать про наявність специфічних змін в нирках і сітківці ока відповідно у 10 та 20 % хворих на ЦД 2-го типу на момент постановки діагнозу [3, 8].

Однією із перших систем, яка реагує на метаболічні зміни при ЦД є система гемокоагуляції. За даними літератури відомо, що при ЦД 2-го типу, окрім реакцій з боку судинно-тромбоцитарного гемостазу в бік підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів, відмічається підвищення рівня фібриногену, факторів V, VII, VIII, X зсідання крові. Гіпертригліцеридемія, характерна для метаболічного синдрому, може пригнічувати фібриноліз і стимулювати процес гемокоагуляції [2, 9]. Отже, важливу роль при ЦД мають порушення функціонально-структурних компонентів гемостазу – судинно-тромбоцитарно ланки і ферментативних систем плазми крові (зсідальної, фібринолітичної, калікреїн-кінінової і комплементу) [12, 13]. Фактори, що сприяють підвищенню активності системи зсідання крові у осіб з порушенням толерантності до вуглеводів: підвищення рівня фактора

Віллебранда в плазмі крові, зниження активності тканинного активатора плазміногену, гіперфібриногенемія, підвищення активності ІАП-1, пригнічення фібринолізу, дисфункція ендотелію, підвищення агрегаційної властивості тромбоцитів, тромбофілія [2].

Мета дослідження – вивчити стан коагуляційної ланки гемостазу та системи фібринолізу при ускладненнях мікроциркуляторного русла – діабетичній ретинопатії та діабетичній нефропатії на тлі експериментального ЦД 2 типу.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 240-280 г, які були розподілені на 4 експериментальні групи (по 6 тварин в кожній): 1 група – інтактний контроль – здорові тварини, що утримувалися на стандартному харчовому раціоні віварію; 2 група – тварини, яким відтворювали стрептозотоциновий діабет [4]; 3 група – контрольна патологія – тварини, яким після уведення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДР [3]; 4 група – тварини, яким після уведення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДН [1].

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 стрептозотоцину готували в 0,1 М цитратному буфері рН 4,5. З метою зниження діабетогенної дії стрептозотоцину за 15 хвилин до його введення, внутрішньоочередово 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.

Через 1 тиждень проводили глюкозотолерантний 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.

Оскільки еритропоєтин є індуктором ангіогенезу та тим самим є ключовою ланку в протіканні ДР, з метою відтворення ДР вводили підшкірно розчин еритропоєтину 3 рази на тиждень по 6 Од на 100 г маси тіла протягом 6 місяців [3].

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

Для дослідження коагуляційного гемостазу використовували цитратну плазму бідну на тромбоцити та цитратну плазму багату на тромбоцити. Цитратну плазму багату на тромбоцити отримували при центрифугуванні стабілізованої цитратом крові (кров + 3,8 % цитрат натрію у співвідношенні 1:9) при 1000 – 1500 об/хв протягом 5 – 7 хв. Цитратну плазму бідну на тромбоцити отримували подвійним центрифугуванням: спочатку отримували плазму багату на тромбоцити, а потім, ще раз центрифугували протягом 15 – 20 хв при температурі + 4°C при 3000 – 4500 об/хв.

З метою оцінки змін коагуляційної ланки гемостазу при ускладненнях ЦД 2 типу використовували наступні показники: активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ) за J. Caen; протромбіновий час (ПЧ) за А. J. Quick; тромбіновий час (ТЧ) за методом Biggs et al.; рівень фібриногену гравіметричним методом за Р. А. Рутберг [2].

Оцінку фібринолітичної системи крові проводили за наявністю Д-димеру, розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) та антитромбіну ІІІ (АТ ІІІ) [2].

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 Стюдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при $p < 0,05$ [5].

Результати та їх обговорення. В плазмовому (коагуляційному) механізмі зсідання крові, результатом якого є утворення фібрину, основна роль належить плазмовим факторам

(фібриногену, протромбіну та ін.) [2].

Перша фаза плазмового гемостазу – утворення протромбінази. Показником, що характеризує першу фазу коагуляції є АЧТЧ [9]. В проведених дослідженнях встановлено, що даний показник підвищувався в 1,3 рази ($p<0,05$) в групі щурів, яким моделювали ЦД 2 типу порівняно із групою інтактного контролю. У групі тварин, яким відтворювали ДР на тлі ЦД 2 типу рівень АЧТЧ підвищувався в 1,4 рази ($p<0,05$), а у щурів, яким моделювали ДН – в 1,5 разів ($p<0,05$) відносно інтактної групи. Одержанні дані вказують про порушення в системі внутрішнього каскаду зсідання крові (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни коагуляційного гемостазу при діабетичній ретинопатії та діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2 типу ($X\pm S_x$, $n=6$)

Показник	Інтактний контроль	Тварини з експериментальним ЦД 2 типу	Тварини з експериментальною ДР	Тварини з експериментальною ДН
АЧТЧ, с	23,6±0,8	30,0±2,1*	32,4±2,2*	35,6±2,4*
ПЧ, с	12,2±0,5	11,7±0,5	11,2±0,6	10,7±0,5
ТЧ, с	32,6±1,2	28,2±1,6	25,6±1,4*	22,4±1,1*
Рівень фібриногену, г/л	4,6±0,4	17,9±0,9*	18,6±0,9*	22,3±0,5*

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

Друга фаза плазмового гемостазу – утворення тромбіну. В цю фазу протромбіназа разом із факторами коагуляції V, VII, X та IV переводить неактивний протромбін в активну форму – тромбін [2]. Показником, що характеризує дану фазу є ПЧ. У всіх групах експериментальних тварин відмічалось недостовірне зниження даного показника порівняно із групою тварин інтактного контролю.

Третя фаза – утворення фібрину. Показниками, які характеризують дану фазу є ТЧ та рівень фібриногену. ТЧ характеризує кінцевий етап процесу зсідання – перетворення фібриногену в фібрин під дією тромбіну.

За умов експериментального ЦД 2 типу спостерігали скорочення ТЧ на 13 % порівняно із групою інтактного контролю. У групі щурів, яким моделювали ДР даний показник скорочувався на 21 % ($p<0,05$), а у групі тварин з ДН – на 32 % ($p<0,05$).

Рівень фібриногену у групі тварин, яким відтворювали ЦД 2 типу підвищувався в 3,9 разів ($p<0,05$); у групі щурів з експериментальною ДР – в 4,0 рази ($p<0,05$); у групі тварин з ДН – в 4,8 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактного контролю.

Одержані дані підтверджують наявність порушень в системі плазмового гемостазу (підвищення утворення згустку фібрину на останній стадії зсідання крові). Окрім цього, оскільки фібриноген є одним із білків «гострої фази», концентрація яких підвищується як при порушенні в системі коагуляції, так і при запальних процесах [2].

Одним із найбільш достовірних маркерів, що характеризує систему фібринолізу є визначення наявності Д-димерів в кров'яному руслі (продукти розпаду фібрину). При проведенні експерименту встановлено, що в усіх групах моделюваної патології відмічали позитивний результат порівняно із групою інтактного контролю (табл. 2).

Таблиця 2

Вивчення системи фібринолізу при діабетичній ретинопатії та діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2 типу ($X\pm S_x$, $n=6$)

Показник	Інтактний контроль	Тварини з експериментальним ЦД 2 типу	Тварини з експериментальною ДР	Тварини з експериментальною ДН
Д-димери, ±	—	+	+	+
РФМК, ±	—	+	+	+
АТ-III, с	120,2±7,1	91,8±4,6*	81,1±3,7*	75,9±3,2*

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

При визначенні наявності РФМК встановлено, що у всіх групах щурів з експериментальними модельованими патологіями спостерігалось виявлення даних комплексів порівняно із групою інтактних тварин.

Рівень АТ-III знижувався у групі тварин з експериментальним ЦД 2 типу в 1,3 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактних тварин. У групі щурів, яким моделювали ураження мікроциркуляторного руслу на тлі ЦД 2 типу встановлено зниження рівня АТ-III в 1,5 разів ($p < 0,05$) при ДР та в 1,6 разів ($p < 0,05$) при ДН відносно групи інтактного контролю.

Одержані дані вказують на те, що активність системи фібринолізу була нижчою у щурів з ДН порівняно із групою тварин, яким відтворювали ДР та у групі тварин з ЦД 2 типу.

Висновки:

1. При вивченні плазмового гемостазу встановлено, що зміни коагуляції при мікроциркуляторних ураженнях на тлі ЦД 2 типу починаються вже із першої ланки – утворення протромбінази.

2. Більш виражені порушення в бік підвищення процесу зсідання крові спостерігали у групі тварин, яким відтворювали ДН порівняно із групою тварин, яким моделювали ДР.

3. Досліджено, що активність системи фібринолізу була нижчою у щурів з ДН порівняно із групою тварин, яким відтворювали ДР та у групі тварин з ЦД 2 типу.

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 нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 292 с.

3. Биомаркеры диабетической ретинопатии / М. В. Будзинская, Д. В. Липатов, В. Г. Павлов, Д. В. Петрачков // *Сахарный диабет*. 2020. № 1 (23). С. 88–94.

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. Нарушение антитромботических свойств эндотелия при сахарном диабете и их коррекция пептидными препаратами / А. А. Елагина, Ю. Д. Ляшев, Е. Б. Артюшкова, А. Ю. Ляшев // *Вестник ВолгГМУ*. 2020. № 1 (73). С. 156–159.

7. Резніков О. Г., Соловійов 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. 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.

9. Coagulation profile on diabetes and its association with diabetic microvascular complications / R. Madan, B. Gupta, S. Saluja et al. // *Journal Assoc Physicians India*. 2010. № 58. P. 481–484.

10. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD / Lars Ryben, Peter J. Grant, Stefan D. Anker et al. // *European Heart J*. 2013. № 34. P. 3035–3087.

11. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy / J. W. Yau, S. L. Rogers, R. Kawasaki et al. // *Diabetes care*. 2012. Vol. 3 (35). P. 556–564.

12. Heart rate-corrected QT interval is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study / F. J. Cox, A. Azeem, J. Veboah et al. // *Diabetes care*. 2014. № 5 (37). P. 1454–1461.

13. Kohl T., Gehrke N., Schad A. Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog cFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells. *Cell Death and Dis*. 2013. doi:10.1038/cddis.2013.228

References:

1. Bayrasheva V.K. Simulation of diabetes mellitus and diabetic nephropathy in experiment. Modern problems of science and education. 2015. № 4. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>
2. Barkagan Z.S., Momot A.P. Diagnostics and controlled therapy of hemostasis disorders. M.: Nyudiamed, 2008. 292 с.
3. Biomarkers of diabetic retinopathy / M. V. Budzinskaya, D. V. Lipatov, V. G. Pavlov, D. V. Petrachkov // Diabetes mellitus. 2020. № 1 (23). С. 88–94.
4. Preclinical studies of drugs: a method. rivers / for ed. Corresponding Member NAMS of Ukraine, acad. OV Stefanova. K.: Avicenna, 2001. 528 с.
5. Methods of statistical processing of medical data: method. rivers. / A. G. Kochetov, O. V. Lyang, I. V. Zhirov et al. M.: RKNPK, 2012. – 42 с.
6. Violation of the antithrombotic properties of the endothelium in diabetes mellitus and their correction with peptide drugs / A. A. Elagina, Yu. D. Lyashev, EB Artyushkova, A. Yu. Lyashev // Bulletin of Volgograd State Medical University. 2020. № 1 (73). С. 156–159.
7. Reznikov OG, Solovyov AI, Stefanov OV Biotic examination of preclinical and other scientific researches performed on animals: method. recommendations. Bulletin of Pharmacology and Pharmacy. 2006. № 7. С. 47–61.
8. Tsitovsky MN Statistical, clinical and morphological aspects of the influence of diabetes on the state of the cardiovascular system. Scientific Bulletin of Uzhhorod University. 2017. T. 55, Vip. 1. С. 168–177.
9. Coagulation profile on diabetes and its association with diabetic microvascular complications / R. Madan, B. Gupta, S. Saluja et al. // *Journal Assoc Physicians India*. 2010. № 58. P. 481–484.
10. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD / Lars Ryben, Peter J. Grant, Stefan D. Anker et al. // *European Heart J*. 2013. № 34. P. 3035–3087.
11. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy / J. W. Yau, S. L. Rogers, R. Kawasaki et al. // *Diabetes care*. 2012. Vol. 3 (35). P. 556–564.
12. Heartrate-correctedQTinterval is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study / F. J. Cox, A. Azeem, J. Veboah et al. // *Diabetes care*. 2014. № 5 (37). P. 1454–1461.
13. Kohl T., Gehrke N., Schad A. Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog cFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells. *Cell Deat and Dis*. 2013. doi:10.1038/cddis. 2013.228

Робота надійшла в редакцію 01.10.2020 року.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування