

ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ РЕОЛОГИИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Кручинина М.В.¹, Громов А.А.¹, Паруликова М.В.¹, Головин М.Г.¹, Баум В.А.¹, Генералов В.М.², Генералов К.В.², Кручинин В.Н.³

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, e-mail: office@iimed.ru;

²Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: vector@vector.nsc.ru;

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, e-mail: ifp@isp.nsc.ru

Представлены возможности диагностики реологических нарушений у больных с сахарным диабетом, основанный на исследовании электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток. Выявлены наиболее значимые в плане диагностики микрореологических нарушений при диабете характеристики эритроцитов: средний диаметр эритроцита, амплитуда деформации при частоте 10^6 Гц, степень деформации при $0,5 \times 10^6$ Гц, обобщенные показатели вязкости и жесткости, величина дипольного момента, электропроводность клеток (AUC 0,713-0,982). Получены дискриминирующие значения данных показателей для различной степени выраженности реологических нарушений при сахарном диабете 2 типа. Определены чувствительность (97,8 %) и специфичность (86,7 %) при использовании совокупности параметров эритроцитов в целях диагностики степени микроциркуляторных нарушений по сравнению с данными по критериям оценки риска развития сосудистых осложнений у больных с сахарным диабетом, предложенными Европейской диабетической ассоциацией (EASD).

Ключевые слова: диагностика, степень нарушений, реология, сахарный диабет, эритроциты, диэлектрофорез.

DIAGNOSTIC POSSIBILITIES OF RHEOLOGY DISORDERS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Kruchinina M.V.¹, Gromov A.A.¹, Parulikova M.V.¹, Golovin M.G.¹, Baum V.A.¹, Generalov V.M.², Generalov K.V.², Kruchinin V.N.³

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, e-mail: office@iimed.ru;

² Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: vector@vector.nsc.ru;

³ Rzhanov Institute of Semiconductor Physics Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, e-mail: ifp@isp.nsc.ru

Diagnostic possibilities of rheological disorders in patients with diabetes mellitus is presented, based on the study of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes by dielectrophoresis using an electrooptical cell detection system. The most significant characteristics in the diagnosis of micro-rheological abnormalities in diabetes were the mean erythrocyte diameter, the amplitude of erythrocyte deformation at a frequency of 10^6 Hz, the degree of deformation at 0.5×10^6 Hz, the summarized parameters of viscosity and rigidity, the magnitude of the dipole moment, the electrical conductivity of cells (AUC 0.713-0.982). Discriminatory values of these indices for different degree of severity of rheological disorders in type 2 diabetes mellitus were obtained. Sensitivity (97.8 %) and specificity (86.7 %) were determined with the use of a set of erythrocyte parameters in order to diagnose the degree of microcirculatory disorders in comparison with the data on criteria for assessing the risk of vascular complications in diabetic patients proposed by the European Diabetes Association (EASD).

Keywords: diagnostics, degree of disorders, rheology, diabetes, erythrocytes, dielectrophoresis.

Ранняя инвалидизация и летальность больных сахарным диабетом (СД), причиной которых, как правило, являются диабетические ангиопатии, представляет собой важнейшую

медико-социальную проблему современной диабетологии [1]. Своевременное выявление микроциркуляторных нарушений, коррекция гемореологических расстройств в настоящее время признается в качестве значительного компонента современной диагностической и лечебной тактики в отношении больных с СД. Микрореологические свойства красных кровяных клеток крови, такие как деформируемость, агрегационная способность и генерация вазореактивных факторов, определяются особенностями молекулярной организации эритроцитарной мембраны и примембранного цитоплазматического матрикса [2, 3].

Метод диэлектрофореза, как показали предшествующие исследования [4, 5], позволяет исследовать изменения в различных компонентах клетки (мембране, ее внутреннем содержимом) путем использования различных частот неоднородного переменного электрического поля. Такие параметры, измеряемые с помощью диэлектрофореза, как амплитуда деформации клетки, обобщенные показатели вязкости, жесткости будут отражать мембранные сдвиги, повышение внутренней жесткости в связи с высоким уровнем гликозилированного гемоглобина (HbA1c). С другой стороны, скорость движения клеток к электродам, величина дипольного момента, емкость клеток будут отражать биохимические сдвиги в сыворотке крови, ассоциированные с СД (нарушение липидного, пуринового обмена и др.). Поляризуемость клеток, уровень гемолиза и агрегации связаны с измененными условиями процессов созревания клеток красной крови, демонстрируют их сниженную стойкость к действию различных факторов, что впоследствии скажется на взаимодействии с клетками измененного эндотелия.

Таким образом, электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, измеряемые методом диэлектрофореза, позволяют дать ценную информацию, которая имеет непосредственное отношение к развитию нарушений реологии при СД.

Цель настоящей работы: представить возможности диагностики нарушений реологии у пациентов с СД 2 типа, основанные на измерении электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза.

Материалы и методы

Обследовано 62 человека в возрасте ($58,7 \pm 1,6$ лет) с СД 2 типа, из них 43 (69,4 %) женщины и 19 (30,6 %) мужчин. Группа сравнения состояла из 38 обследуемых в возрасте $48,5 \pm 2,2$ года – 24 (63,2 %) женщины и 14 (36,8 %) мужчин без СД и какой-либо другой манифестирующей патологии внутренних органов, обратившихся с профилактической целью (1-я группа).

Комитетом Биомедицинской Этики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института терапии и профилактической

медицины» (заседание от 18.12.2015 г.) подтверждена возможность выполнения обследования.

Пациентам проведено комплексное клиническо-инструментальное обследование, включая ЭКГ, УЗИ органов брюшной полости, почек, сердца и сосудов, офтальмоскопию глазного дна, определение гликозилированного гемоглобина, альбумин/креатинин-соотношения в разовой порции мочи.

Исследование электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов проведено методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток [4]. Для проведения исследований кровь объемом 2 мл забирали вокутайнерами в 3,7% цитратный буфер в соотношении 9:1, менее чем через 1 час кровь вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН 7,36) в соотношении 1:20. Сразу после разведения эритроцитов производились измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали неоднородным переменным электрическим полем (НПЭП) со следующими параметрами: напряженность электрического поля 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля 10^{11} В/м², частотный диапазон $5 \cdot 10^4 - 10^6$ Гц. Анализировались поляризуемость клеток, емкость и электропроводность мембран, положение равновесной частоты, индексы агрегации и деструкции эритроцитов, скорость движения клеток к электродам, величина индуцированного дипольного момента, амплитуда деформации эритроцитов на частоте 10^6 Гц, степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц, обобщенные показатели вязкости и жесткости клеток красной крови. Данные обработаны с помощью пакета оригинальных компьютерных программ CELLFIND (разработка ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Ошибка воспроизводимости метода составила 7–12 %.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 17. Методом Колмогорова – Смирнова определен характер распределения количественных признаков. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m) (Вычисляется $\pm m$). При нормальном распределении достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона. При отклонении распределения от нормального применены непараметрические критерии (U-критерий Манна – Уитни, Колмогорова – Смирнова, хи-квадрат). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для оценки значимости параметров эритроцитов с точки зрения дифференцирования степени реологических нарушений при сахарном диабете 2 типа был использован ROC-анализ.

Результаты и обсуждение

В соответствии с критериями оценки риска развития сосудистых осложнений у диабетиков, предложенных Европейской диабетической ассоциацией (EASD, 2013) [6],

пациенты с СД были разделены на 2 группы – со средним риском поражения мелких сосудов (средняя степень реологических – микроциркуляторных нарушений) – 2-я группа (n=47) и высоким риском микроциркуляторных нарушений – 3-я группа (n=15). Показатели пациентов указанных групп оказались в пределах значений, соответствующих риску поражения крупных и мелких сосудов.

Данные клинико-инструментальных обследований групп представлены в таблице 1. Не установлено достоверных различий по возрасту, полу, стилю потребления алкоголя, курению в группах пациентов с СД. Однако в группе с высокой степенью реологических нарушений (3-я группа) оказались достоверно более длительными стаж СД, продолжительность артериальной гипертензии, чаще выявлялся семейный анамнез ранних сердечно-сосудистых заболеваний, наличие ИБС с инфарктами миокарда в анамнезе. У пациентов 3-й группы оказались более высокими, чем во 2-й группе, цифры систолического и диастолического артериального давления, чаще отмечены нарушения ритма, проводимости сердца ($p < 0,05$). Все пациенты с СД получали сахароснижающую терапию, направленную на достижение целевых параметров контроля углеводного обмена, антигипертензивные средства.

Пациенты с высокой степенью реологических нарушений оказались более тяжелыми по выраженности проявлений СД и его осложнений: в данной группе оказались более высокими уровни гликемии натощак ($9,62 \pm 0,69$ против $7,94 \pm 0,33$ во второй группе, $p = 0,018$), гликозилированного гемоглобина, альбумин/креатинин-соотношения в разовой порции мочи, более значительными проявления гиперлипидемии (с преобладанием ГЛП 2Б типа), нарушения пуринового обмена, функции печени, выделительной функции почек.

Таблица 1

Клинико-биохимические данные в группах больных с СД, отличающихся по степени нарушений микроциркуляции ($M \pm m$).

Клинико-биохимические показатели	1-я группа, сравнения, n=38	2-я группа СД, n=47	3-я группа СД, n=15
Возраст, годы	$48,47 \pm 2,18$	$59,64 \pm 1,18$	$57,87 \pm 2,09$
Пол (чел.)	Ж – 24 М – 14	Ж – 35 М – 12	Ж – 8 М – 7
Индекс массы тела ($кг/м^2$)	$27,52 \pm 0,61$	$31,74 \pm 0,82$ **	$35,62 \pm 0,97$ ***^
Стаж сахарного диабета (годы)	-	$8,2 \pm 3,2$	$14,2 \pm 2,7^{\wedge}$
Продолжительность артериальной гипертензии (годы)	-	$9,8 \pm 4,3$	$15,9 \pm 3,9^{\wedge}$

Семейный анамнез ранних сердечно-сосудистых заболеваний, n (%)	2 (5,3%)	18 (38,3%) ***	9 (60%) ***^^^
Стадии диабетической ретинопатии, n (%)			
0 – нет	38 (100)	14 (29,8)	0
1 – непролиферативная	0	24 (51,1)	6 (40)
2 – препролиферативная	0	8 (17,0)	6 (40)
3 – пролиферативная	0	1 (2,1) ****	3 (20) ****^^^
Стадии диабетической ангиопатии, n (%)			
0 – нет	38 (100)	0	0
1 – I (бессимптомная)	0	24 (51,1)	0
2 – II А	0	20 (42,6)	4 (26,7)
3 – II Б	0	3 (6,3)	8 (53,3)
4 – III	0	0 ****	3 (20) ****^^^
Гликозилированный гемоглобин (HbA1c),%	4,78±0,11	6,59±0,025 ****	8,01±0,07 ****^^^
Альбумин/креатинин-соотношение в разовой порции мочи, мг/ммоль	2,23±0,06	3,34±0,035 ****	4,1±0,044 ****^^^
Общий холестерин, мг/дл	183,7±5,9	208,48±6,35 ***	217,5±11,7 ***
Холестерин ЛПВП, мг/дл	51,43±1,92	49,33±1,52	42,46±2,74 **^^
Триглицериды, мг/дл	126,08±14,5	188,9±27,7 *	222,3±20,42 ***
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	5,76±0,13	7,94±0,33 ****	9,62±0,69 ****^^
Мочевая кислота, мг/дл	360±18	390±15	420±29
Креатинин, мкмоль/л	74,07±1,58	74,94±1,42	84,28±5,43 **^^
Мочевина, ммоль/л	4,5±0,28	5,51±0,31 **	6,04±0,34 ***
Количество эритроцитов, x10 ¹² /л	4,59±0,096	4,63±0,07	4,60±0,17
Уровень гемоглобина, г/л	141,79±2,25	140,93±4,5	140,79±2,25
Цветовой показатель	0,92±0,009	0,91±0,008	0,87±0,019 *
Гематокрит, %	42,41±0,58	43,11±0,64	44,79±0,89 *

Средний корпускулярный объем эритроцита (MCV), fl	93,78±0,52	92,89±0,74	89,81±1,46 ***^
Среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH), пг	31,21±0,29	30,58±0,31	29,47±0,67 ***
Приблизительная концентрация имеющегося гемоглобина в крови (MCHC), г/л	333,11±2,12	329,58±2,2	326,4±3,56
Ширина распределения эритроцитов по объему (RDW-CV), %	13,84±0,08	14,11±0,09 *	13,95±0,18
Относительная ширина распределения эритроцитов по объему (RDW-SD), fl	50,43±0,36	50,17±0,44	48,49±0,65 *** ^

Примечания:

* – достоверность (p) отличия от 1-й группы: * – p<0,05, ** – p<0,02, *** – p<0,01, **** – p<0,0001;

^ – достоверность (p) отличия от 2-й группы больных с СД: ^ – p<0,05, ^^ – p<0,02, ^^ ^ – p<0,01, ^^ ^^ – p<0,0001.

Стоит отметить, что пациенты с выраженными нарушениями реологии имели больший индекс массы тела, большую выраженность диабетической нейропатии, ретинопатии (у 60 % больных выявлены про- и пролиферативная ретинопатия), ангиопатии (в 53,3 % случаях она соответствовала ПБ степени, когда боли в нижних конечностях возникали при ходьбе менее 200 метров, p<0,0001).

Анализ параметров красной крови не выявил наличие достоверных различий в группах по количеству эритроцитов, уровню цветового показателя и гемоглобина. Вместе с тем установлено, что пациенты с СД имели повышенный гематокрит, большую ширину распределения эритроцитов по объему, а средний корпускулярный объем, среднее содержание гемоглобина в эритроците оказались ниже, чем у здоровых лиц (p=0,047; p=0,033; p=0,002; p=0,009, соответственно для вышеуказанных показателей).

Изучение вязкоупругих и электрических показателей эритроцитов у пациентов с СД

Эритроциты лиц группы сравнения при исследовании в НПЭП продемонстрировали высокую скорость движения к электродам и высокий уровень пластичности на частотах $5 \cdot 10^5$ Гц и 10^6 Гц (рисунок 1а). На низких частотах ($5 \cdot 10^4$ Гц, 10^5 Гц) отмечено отталкивание клеток от электродов (отрицательный диэлектрофорез) с гемолизом отдельных эритроцитов под действием электрического поля [5].

У больных с СД поведение эритроцитов в НПЭП существенно отличалось: высоких частотах $5 \cdot 10^5$ Гц и 10^6 Гц способность клеток к деформации (м) и скорость поступательного движения клеток (мкм/с) к электродам оказались достоверно ниже (p<0,01) (рисунок 1б). Выраженная деструкция эритроцитов наблюдалась на всех частотах НПЭП (рисунок 1в).

Кроме того, клетки были склонны к образованию агрегатов различных размеров ($p < 0,02$) (рисунок 1г).

Установлены различия в характеристиках клеток красной крови, ассоциированные со степенью реологических нарушений при СД. Большая часть эритроцитов пациентов со средней степенью реологических нарушений (2-я группа) в растворе диэлектрика имела форму дискоцитов, 24 ± 6 % клеток становились сфероцитами или имели форму «спущенного мяча». У больных с выраженными микроциркуляторными нарушениями (3-я группа) отмечено увеличение доли недискоцитарных форм до 48 ± 6 % ($p < 0,001$), при этом около четверти дискоцитов становились шиповидными. Известно, что целостность мембраны и двояковогнутая форма эритроцитов в значительной степени обеспечивается энергией макроэргических соединений [7], главным образом, за счет различных форм АТФ, возникающих в процессе гликолиза, являющегося основным путем энергетического обмена в эритроцитах [8].

Снижение уровня АТФ в клетках красной крови сопровождается блокированием ионных насосов, что приводит к сдвигам ионного баланса в системе среда-клетка. Данный процесс способствует снижению отношения площади поверхности к объему эритроцитов, сфероцитарной трансформации клеток красной крови, возникновению шиповидных отростков. Подобные сдвиги приводят к затруднению транспорта кислорода из эритроцита к тканям и усугубляет гипоксию, которая стимулирует явления фиброгенеза с внутренним ремоделированием сосудистых стенок, вызывая прогрессирование диабетической ангиопатии [3, 8].

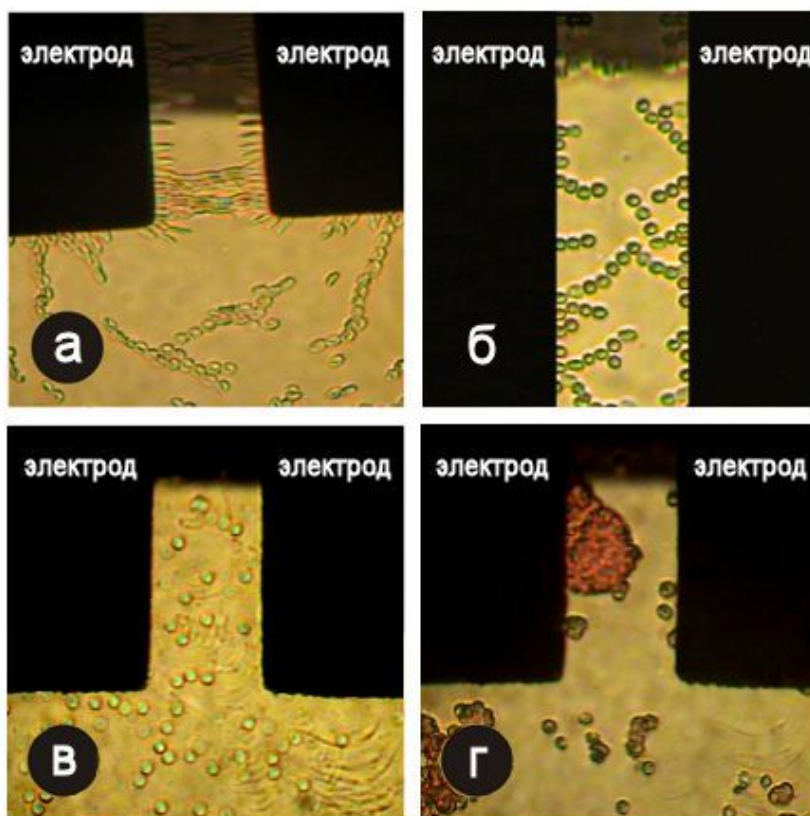


Рис. 1. Поведение эритроцитов под действием НПЭП на частоте 10^6 Гц: а – у здоровых лиц; б, в, г – у пациентов с СД (см. текст)

По мере нарастания степени выраженности реологических нарушений (от 2-й к 3-й группе пациентов с СД) отмечено нарастание уровней электропроводности, индексов агрегации, деструкции, обобщенных показателей вязкости, жесткости. Вместе с тем амплитуда деформации клеток красной крови, поляризуемость на частоте 10^6 Гц, величина дипольного момента, электрическая емкость мембран эритроцитов, как и скорость движения клеток к электродам, значительно снижались ($p < 0,001-0,05$) (таблица 2). Степень выраженности микроциркуляторных нарушений при СД оказалась обратно связанной с амплитудой деформации ($r = -0,652$, $p < 0,0001$) и прямо – с обобщенными показателями вязкости ($r = 0,680$, $p < 0,0001$) и жесткости клеток красной крови ($r = 0,635$, $p < 0,0001$).

Известно, что деформируемость клеток красной крови обусловлена их вязкоупругими характеристиками [8]. По результатам настоящего исследования, выявлено снижение способности эритроцитов к деформации на фоне нарастания обобщенных показателей вязкости и жесткости клеток. Данные сдвиги могут быть связаны с повышением содержания холестерина в мембране эритроцитов, увеличением индекса холестерин/фосфолипиды.

Таблица 2

Электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов у больных с СД с разной степенью микроциркуляторных нарушений ($M \pm m$)

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов	1-я группа, сравнения, n=38	2-я группа, СД, n=47	3-я группа, СД, n=15
Диаметр эритроцита [мкм]	7,55±0,008	7,45±0,011 ****	7,33±0,013 ****^^^
Амплитуда деформации на частоте 10 ⁶ Гц, [м]	(8,16±0,11)·10 ⁻⁶	(6,18±0,06)·10 ⁻⁶ ****	(5,2±0,04)·10 ⁻⁶ ****^^^
Степень деформации клеток на частоте 5x10 ⁵ Гц (%)	73,1± 1,97	41,55±1,15 ****	25,86± 1,34 ****^^^
Обобщенный показатель жесткости, [Н/м]	(5,57±0,16)·10 ⁻⁶	(8,62±0,04)·10 ⁻⁶ ****	(10,12±0,03)·10 ⁻⁶ ****^^^
Обобщенный показатель вязкости, [Па·с]	0,51±0,009	0,70±0,002 ****	0,78±0,005 ****^^^
Электропроводность клеток, [См/м]	(5,53±0,11)·10 ⁻⁵	(6,83±0,21)·10 ⁻⁵ ****	(7,96±0,38)·10 ⁻⁵ ****^^^
Емкость клеток, [Ф]	(7,3±0,19)·10 ⁻¹⁴	(4,44±0,42)·10 ⁻¹⁴ ****	(4,10±0,74)·10 ⁻¹⁴ ****
Скорость движения Eг к электродам, [мкм/с]	7,74±0,19	4,57±0,18 ****	4,2 ±0,34 ****
Положение равновесной частоты, [Гц]	(5,5±0,58)·10 ⁵	(11,8±2,2)·10 ⁵ ****	(16,0±6,0)·10 ⁵ ***
Дипольный момент [Кл·м]	12,4·10 ⁻²² ± 4,19·10 ⁻²²	7,22·10 ⁻²² ± 0,15·10 ⁻²² ****	4,75·10 ⁻²² ± 0,25·10 ⁻²² ****^^^
Поляризуемость эритроцитов на частоте 10 ⁶ Гц, [м ³] (x10 ⁻¹⁵)	0,574±0,005	0,459±0,017 ****	0,438±0,005 ****
Индекс деструкции Eг на 10 ⁶ Гц (%)	0	2,4±0,1	3,4±0,53
Индекс деструкции на 5x10 ⁵ Гц(%)	0	2,8±0,47	3,11±0,32
Индекс деструкции на 10 ⁵ Гц (%)	0	2,3±0,5	5,0±0,4^
Индекс деструкции на 5x10 ⁴ Гц (%)	0	2,0±0,6	4,1±0,32^
Индекс агрегации эритроцитов, усл. ед.	0,62±0,003	0,64±0,005	0,65±0,007*

Примечания: 1. Величина дипольного момента определялась при напряженности электрического поля 8,85·10⁻¹²Ф/м.

2. * – достоверность (p) отличия от 1-й группы: * – p<0,05, ** – p<0,02, *** – p<0,01, **** – p<0,0001;

^ – достоверность (p) отличия от 2-й группы больных с СД: ^ – p<0,05, ^^ – p<0,02, ^^ – p<0,01, ^^ – p<0,0001.

Вследствие обмена холестерина между эритроцитами и адсорбированными на их поверхности липопротеидами происходит встраивания холестерина в мембрану клеток красной крови. В ходе этого процесса возрастают их размеры, происходит трансформация со значительным снижением фильтрационной способности клеток [1, 2, 9].

Подобные изменения являются причиной микроциркуляторных нарушений с нарастанием риска развития ишемических состояний, в том числе возникновения диабетической стопы. Снижение пластичности клеток под действием НПЭП, прогрессирующее с увеличением степени нарушений реологии при сахарном диабете, можно

рассматривать как «модель» поведения эритроцитов на уровне капилляров, размеры которых более чем в 2,5 раза меньше диаметра клеток. С одной стороны, «жесткие и хрупкие» эритроциты, склонные к агрегатообразованию, в таких условиях легко разрушаются, а агрегаты повреждают эндотелиальную выстилку.

С другой стороны, обширные области капиллярного русла оказываются «выключенными» из кровотока и кислородного обмена, поскольку агрегаты и ригидные клетки не способны проникнуть в зоны мельчайших сосудов. «Разрежение» капиллярного русла еще более усугубляет гипоксию, ишемию на периферии [10].

Склонность к избыточной деструкции и агрегации у пациентов с СД ассоциирована с низкими уровнями поляризуемости клеток ($r=-0,60$, $p=0,02$; $r=-0,53$, $p=0,04$, соответственно). Поскольку поляризуемость отражает биологическую активность клеток, ее прогрессирующее снижение по мере утяжеления СД, вероятно, связано с активацией ускоренного малоэффективного эритропоза при данном заболевании. Активация юкстагломерулярного аппарата почек, связанная с нарастанием сужения артерий почек, приводит к повышению синтеза эритропоэтина, который является стимулятором ускоренного синтеза эритроцитов [8]. Ускоренное созревание клеток красной крови сопровождается выбросом на периферию клеток с измененной структурой мембран, в том числе с избыточной презентацией карбоксильных групп, повышенным уровнем структурно модифицированного спектрина, лизофракций фосфолипидов. Следствием этого является преобладание в популяции клеток красной крови доли эритроцитов со сниженной резистентностью к воздействию различных стрессовых факторов. Измененная структура поверхности эритроцитов с признаками преждевременного старения является сигналом для иммунокомпетентных клеток для извлечения их из кровотока. При деструкции эритроцитов происходит внутрисосудистое высвобождение внутриэритроцитарных АДФ, АТФ, гемоглобина, которые являются мощными стимуляторами образования агрегатов, в том числе и смешанных (лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарных), что объясняет высокие показатели индексов деструкции и агрегации на всех частотах в нашей работе [10]. Вместе с тем нарастание агрегации эритроцитов ассоциировано с выделением агрегатами клеток тромбопластических веществ, связанных с клеточной мембраной, что создает локальное состояние гиперкоагуляции. Данный процесс способствует внутрисосудистому свертыванию крови и обуславливает вторичное нарушение гемодинамики в микроциркуляции [3, 11].

Установлены корреляции параметров эритроцитов с рядом клинико-биохимических показателей, показателей красной крови. Следует отметить, что большая часть параметров эритроцитов оказалась связанной с *уровнем гликемии натощак* ($r=-0,348$, $p=0,005$ – с амплитудой деформации на 10^6 Гц; $r=-0,266$, $p=0,034$ – со степенью деформации на 5×10^5 Гц;

$r=0,439$, $p<0,0001$ – с обобщенным показателем вязкости; $r=0,338$, $p=0,006$ – с обобщенным показателем жесткости; $r=-0,32$, $p<0,01$ – со средним диаметром эритроцита), гликозилированного гемоглобина ($r=-0,551$, $p<0,0001$ – с амплитудой деформации на 10^6 Гц; $r=-0,677$, $p<0,0001$ – со степенью деформации на 5×10^5 Гц; $r=0,601$, $p<0,0001$ – с обобщенным показателем вязкости; $r=0,63$, $p<0,0001$ – с обобщенным показателем жесткости; $r=-0,49$, $p<0,0001$ – со средним диаметром эритроцита; $r=-0,393$, $p<0,001$ – с дипольным моментом; $r=0,321$, $p<0,01$ – с электропроводностью), соотношением альбумина к креатинину мочи ($r=-0,51$, $p<0,0001$ – с амплитудой деформации на 10^6 Гц; $r=-0,567$, $p<0,0001$ – со степенью деформации на 5×10^5 Гц; $r=0,517$, $p<0,0001$ – с обобщенным показателем вязкости; $r=0,451$, $p<0,0001$ – с обобщенным показателем жесткости; $r=-0,482$, $p<0,0001$ – со средним диаметром эритроцита; $r=-0,514$, $p<0,0001$ – с дипольным моментом; $r=0,247$, $p<0,05$ – с электропроводностью). Известно, что повышенное выделение альбумина с мочой развивается в результате повреждения и дисфункции почечного сосудистого эндотелия, повышения давления в капиллярной сети клубочков (клубочковая гипертензия), нарушения структурной целостности базальной мембраны клубочков, дисфункции канальцевого эпителия [12].

Поскольку два последних показателя отражают степень компенсации углеводного обмена, связь их с электрическими и вязкоупругими характеристиками эритроцитов не удивительна. Гликозилированный гемоглобин заметно повышает внутреннюю вязкость эритроцитов, образуя «сшивки» с мембранами клеток – и обобщенный показатель жесткости [3, 13]. Все это заметно сказывается на способности эритроцитов к деформации. Следует сказать, что амплитуда деформации эритроцитов значимо коррелировала со стажем СД и продолжительностью артериальной гипертензии ($r=-0,563$, $p<0,01$ и $r=-0,42$, $p=0,04$, соответственно).

Установленные корреляции свидетельствуют о вовлеченности клеток красной крови в патогенез развития диабетических осложнений. Связи с показателями *липидного профиля* (для ХС ЛПВП – с амплитудой деформации – $r=0,33$, $p=0,013$, с обобщенной вязкостью $r=-0,27$, $p=0,043$; для ТГ – с амплитудой деформации – $r=0,327$, $p=0,008$, с обобщенной вязкостью $r=0,325$, $p=0,009$, с обобщенной жесткостью – $r=0,27$, $p=0,03$, поляризуемостью на 10^6 Гц $r=-0,875$, $p<0,0001$), *печеночными пробами* (активности АСТ – с электропроводностью $r=0,33$, $p=0,008$; уровня общего билирубина – с амплитудой деформации $r=-0,283$, $p=0,025$, с обобщенной вязкостью $r=0,27$, $p=0,032$, с обобщенной жесткостью – $r=0,248$, $p<0,05$; уровня альбумина – с поляризуемостью на 10^6 Гц $r=0,487$, $p=0,028$) подтверждают наличие взаимодействия клеток красной крови с компонентами сыворотки. Весьма показательны ассоциации характеристик эритроцитов со степенью выраженности диабетической ретино-,

ангиопатии (стадии ретинопатии, ангиопатии коррелировали с амплитудой деформации на 10^6 Гц $r=-0,31$, $p=0,013$, $r=-0,377$, $p=0,002$; со степенью деформации на $5 \times 10^5 \text{ Гц}$ $r=-0,228$, $p=0,005$, $r=-0,414$, $p<0,001$; с обобщенным показателем вязкости $r=0,25$, $p=0,046$, $r=0,429$, $p<0,0001$; с обобщенным показателем жесткости $r=0,248$, $p=0,048$, $r=0,37$, $p=0,003$; со средним диаметром эритроцита $r=-0,325$, $p=0,009$; с величиной дипольного момента $r=-0,762$, $p<0,0001$, $r=-0,454$, $p<0,0001$, для стадии ретино- и ангиопатии, соответственно). Вероятно, сдвиги в структурно-функциональных свойствах эритроцитов вносят вклад в прогрессирование осложнений диабета.

Выявлены ассоциации уровня альбумин/креатининового соотношения в моче с электрическими показателями эритроцитов, а именно – с величиной дипольного момента, который коррелирует с величиной и плотностью поверхностного отрицательного заряда эритроцитов. Диполь отражает пространственную асимметрию распределения электрических зарядов по всему объему клетки. Традиционно определение микроальбуминурии, альбумин/креатининового соотношения в разовой порции мочи используют в клинике для скрининга диабетической нефропатии. Следует отметить, что в последние годы тест на микроальбуминурию стали считать маркером оценки функции плазматических мембран высокодифференцированных клеток, в том числе использовать для определения степени эндотелиальной дисфункции. В норме из-за наличия высокого отрицательного заряда на поверхности эпителиальных клеток отрицательно заряженный альбумин не проходит через гломерулярный фильтр почек. В определенной степени этот заряд детерминирован структурой фосфолипидов клеточных мембран, в состав которых входят полиненасыщенные жирные кислоты.

Уменьшение количества двойных связей в ацильных остатках фосфолипидов приводит к снижению отрицательного заряда, что приводит к избыточной фильтрации альбумина в первичную мочу. Эти нарушения установлены при развитии атеросклероза, поэтому микроальбуминурия развивается при наследственных гиперлипидемиях, артериальной гипертензии, ИБС, СД, у больных с нарушением толерантности к глюкозе.

При СД возникают изменения фосфолипидной структуры мембран высокодифференцированных клеток (в том числе, эритроцитов, эндотелиоцитов, клеток почек), что сказывается на поверхностном заряде мембран. Очевидна причина тесных ассоциаций электрических параметров клеток красной крови и альбумин/креатининового соотношения, которое рассматривается как показатель начальных стадий дисфункции эндотелия, одного из ведущих патогенетических звеньев СД [2, 11].

Установлено, что у больных с СД наблюдался сдвиг равновесной частоты в высокочастотный диапазон (более $5 \cdot 10^5 \text{ Гц}$) ($p<0,01$) (таблица 2). Подобные изменения,

вероятно, обусловлены нарастанием электропроводности эритроцитов при СД. Данный показатель отражает способность мембран проводить электрический ток, что в значительной степени связано с измененной структурой мембран, в частности, с высоким уровнем холестерина. Известно, что увеличение содержания холестерина в мембранах обуславливает нарастание обобщенных показателей вязкости, жесткости эритроцита [14], ограничивает латеральную диффузию рецепторов, изменяет проницаемость для растворенных веществ, транспорт ионов, приводя к увеличению электропроводности клетки [8, 15].

Прогрессирование выраженности реологических нарушений у больных с СД сопровождалось снижением уровня электрической емкости мембран ($p < 0,0001$), что косвенно может свидетельствовать о ее утолщении. Данное обстоятельство, вероятно, связано с рядом факторов. Это и усиление взаимообмена с липидами сыворотки крови, подтверждаемое ассоциациями емкости мембран эритроцитов с уровнем общего холестерина ($r = -0,51$, $p = 0,041$), триглицеридов ($r = -0,40$, $p = 0,03$). Возможно, вносит вклад и адсорбция на поверхности мембран повышенных уровней крупномолекулярных белков (глобулинов, фибриногена, фибрина и др.) в связи с выраженностью воспаления у пациентов с СД.

Величина дипольного момента снижалась у пациентов с СД по мере нарастания тяжести реологических сдвигов, достигнув минимальных значений у больных с высокой степенью микроциркуляторных нарушений (3-я группа), что является признаком снижения электрического заряда клеток красной крови. С одной стороны, это может быть обусловлено изменением среднего корпускулярного объема эритроцитов у больных с СД (таблица 1), которое счет перераспределения гликопротеинов и гликолипидов мембран по поверхности клетки привело к снижению плотности поверхностного отрицательного заряда [8, 10]. С другой стороны, возможно уменьшение абсолютного содержания в мембранах клеток сиаловых и нейраминовой кислот, которые ~на 60 % определяют плотность поверхностного заряда [3, 10]. Наконец, повышенные уровни крупномолекулярных белков (как следствие системного воспаления у пациентов с СД) могут «экранировать» отрицательный заряд эритроцитов, адсорбируясь на поверхности их мембран независимо от антигенной принадлежности. Снижение поверхностного отрицательного заряда эритроцитов повышает склонность клеток к образованию стойких агрегатов [2, 11].

Таким образом, было выявлено, что прогрессирование СД сопровождается процессом деполяризации клеток красной крови. Вместе с тем амплитудно-частотные параметры эритроцитов в НПЭП являются точными индикаторами физико-химических свойств мембраны, цитоплазмы клеток, маркерами биологической активности клеток.

Дискриминирующие значения параметров эритроцитов у пациентов с СД с различной степенью реологических нарушений

Для оценки значимости параметров эритроцитов с точки зрения дифференцирования степени микроциркуляторных нарушений у пациентов с СД был использован ROC-анализ посредством построения ROC-кривых (приемные характеристические кривые) для различных характеристик эритроцитов.

Наиболее точное дискриминирование степени нарушений реологии при СД обеспечивают обобщенные показатели вязкости, жесткости эритроцитов, амплитуда деформации клеточна частоте 10^6 Гц, степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц, величина дипольного момента, электропроводность клеток, в меньшей степени – поляризуемость эритроцитов на частоте 10^6 Гц, морфология, структура поверхности клеток красной крови, скорость движения эритроцитов к электродам (таблица 3). Стандартная ошибка для отдельных показателей находилась в интервале от 0,018 до 0,093, асимптоматическая значимость варьировала от 0,0001 до 0,168.

Таблица 3

Результаты анализа ROC кривых показателей эритроцитов у пациентов с СД по дифференцированию степени реологических нарушений.

Показатели гемостаза	Площадь (AUC)	Асимптотический 95 % доверительный интервал		Специфичность (%)	Чувствительность (%)
		Нижняя граница	Верхняя граница		
Обобщенный показатель вязкости, [Па·с]	0,982	0,946	1,0	98,0	80
Амплитуда деформации 10^6 Гц, [м]	0,979	0,939	1,000	98,0	93,3
Обобщенный показатель жесткости, [Н/м]	0,967	0,92	1,0	98,0	93,3
Дипольный момент, [Кл·м]	0,950	0,884	1,000	98	93,3
Степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц	0,913	0,866	0,996	98	93,3
Диаметр эритроцита [мкм]	0,890	0,798	0,982	77,6	86,7
Электропроводность клеток, [См/м]	0,713	0,565	0,861	83,7	86,7
Поляризуемость эритроцитов на 10^6 Гц, [м ³]	0,696	0,566	0,826	71,4	66,7
Структура поверхности эритроцитов	0,696	0,549	0,843	80,0	40,8
Морфология эритроцитов	0,626	0,463	0,788	60,0	32,7
Скорость движения Ег к электродам, [мкм/с]	0,618	0,436	0,801	71,4	66,7

Результаты оценки «панели» электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у больных с СД 2 типа для установления степени реологических нарушений по сравнению с

критериями оценки риска развития сосудистых осложнений у пациентов с СД, предложенными Европейской диабетической ассоциацией (EASD), представлены в таблице 4. Они представляют достаточно высокие уровни чувствительности (97,8 %) и специфичности (86,7 %), прогностической ценности положительного (95,8 %) и отрицательного результата (92,8 %), а также индекса точности (95,2 %). Повышение точности определения нарушений реологии при использовании совокупности параметров эритроцитов по сравнению с изолированным исследованием отдельных электрических и вязкоупругих показателей красной крови свидетельствуют о необходимости использования «панели вязкоупругих и электрических параметров эритроцитов» для определения степени нарушений реологии при СД 2 типа.

Таблица 4

Результаты оценки совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с СД 2 типа для установления степени реологических нарушений по сравнению с критериями оценки риска развития сосудистых осложнений у больных с СД (EASD).

Результаты использования совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов	Результаты исследования по критериям оценки риска развития сосудистых осложнений при СД (EASD)	
	Группа средней степени реологических нарушений при СД, n = 47 случаев	Группа высокой степени реологических нарушений при СД, n = 15 случаев
Группа средней степени реологических нарушений при СД n = 48 случаев	Истинно положительный группа средней степени реологических нарушений n = 46	Ложно положительный группа высокой степени реологических нарушений n = 2
Группа высокой степени реологических нарушений при СД n = 14 случаев	Ложно отрицательный группа средней степени реологических нарушений n = 1	Истинно положительный группа высокой степени реологических нарушений n = 13

Ниже приведены вычисления основных характеристик метода по Гринхальх Т. [16].

Чувствительность	$46 : (46 + 1) \times 100\% = 97,8 \%$
Специфичность	$13 : (2 + 13) \times 100\% = 86,7 \%$
Прогностическая ценность «+» результата метода	$46 : (46 + 2) \times 100\% = 95,8 \%$
Прогностическая ценность «-» результата метода	$13 : (1 + 13) \times 100\% = 92,8 \%$
Индекс точности	$(46 + 13) / (46 + 2 + 1 + 13) \times 100\% = 95,2 \%$

Следует отметить уровень прогностической ценности «-» результата, что отражает возможности определения истинно положительных результатов по высокой степени микроциркуляторных нарушений. Это перспективно в связи с необходимостью разработки комплекса социальных, терапевтических, адаптационных мероприятий.

Заключение

Таким образом, исследование нарушений реологии у пациентов с СД 2 типа позволило сделать следующие выводы:

– утяжеление реологических нарушений у пациентов с СД сопровождалось достоверным снижением амплитуды деформации, величины дипольного момента, поляризуемости на частоте 10^6 Гц, емкости мембран и нарастанием величин электропроводности, обобщенных показателей вязкости, жесткости, склонности к гемолизу и образованию агрегатов;

– установлены наиболее значимые параметры эритроцитов для дискриминирования степени реологических нарушений при СД 2 типа: обобщенные показатели вязкости, жесткости эритроцитов, амплитуда деформации клеток на частоте 10^6 Гц, степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц, величина дипольного момента, электропроводность клеток (AUC 0,713-0,982);

– определены показатели чувствительности – 97,8 %; специфичности – 86,7 %; прогностической ценности положительного – 95,8 %, отрицательного результата – 92,8 %; а также индекса точности – 95,2 % при использовании в качестве диагностического теста «панели» электрических и вязкоупругих параметров по сравнению с данными по критериям оценки риска развития сосудистых осложнений у больных с СД, предложенными Европейской диабетической ассоциацией (EASD).

Список литературы

1. Lavigne J.-P. New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers / J.-P. Lavigne, A. Sotto, C. Duniach-Remy [et al.] // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2015. – Vol. 4, no. 1. – P. 38–49.
2. Кравец Е.Б. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета / Е.Б. Кравец, Р.Т. Тухватулин, Н.В. Рязанцева [и др.] // *Сахарный диабет*. – 2006, № 1. – С. 10-14.
3. Cho Y.I. Hemorheological disorders in diabetes mellitus / Y.I. Cho, M.P. Mooney, D.J. Cho // *J. Diab. Sci. & Technol.* – 2008. – Vol. 2. – P. 1130-1138.
4. Генералов В.М. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний / В.М. Генералов, М.В. Кручинина, А.Г. Дурьманов [и др.]. – Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. – 172 с.
5. Кручинина М.В. К вопросу о дифференциальной диагностике алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени / М.В. Кручинина, С.А. Курилович, А.А. Громов [и др.]

др.] // Международный журнал фундаментальных и прикладных исследований. – 2016. – Т.7, № 1. – С. 36-45.

6. Ryden L. The task force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed incollaboration with the European Association for the study of diabetes (EASD) / L. Ryden, P.J. Grant, S.D. Anker, [et al.]// European Heart Journal. – 2013. – Vol. 34. – P. 3035-3087.

7. Дерюгина А.В. Адаптационные реакции эритроцитов при действии электромагнитного излучения терагерцового диапазона / А.В. Дерюгина, М.Н. Таламанова, Ю.Н. Хламова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – Т. 1–2, № 55. – С. 6-8.

8. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. – Томск: Из-воТГУ, 2004. – 202 с.

9. Леонова Т.Я. К вопросу об эритроцитарном механизме регулирования холестеринемии при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1982. – 22с.

10. Козинец Г.И. Кровь: стабильность, консерватизм и память гемопоэза / Г.И. Козинец, В.В. Высоцкий, С.А. Луговская // Вестник службы крови России. – 2012. – № 2. – С. 20-27.

11. Дедов И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 6-й выпуск / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М.: ООО «Информполиграф», 2013. – 121 с.

12. Ильин А.В. Гликированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом. Оптимальная организация исследований / А.В. Ильин, М.И. Арбузова, А.П. Князева // Сахарный диабет. – 2008. – № 2. – С. 60-64.

13. Hyun Joo P. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging / P. Hyun Joo, L. Sang Yun, J. Misuk [et al.] // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 34257-9.

14. Камкин А. Физиология и молекулярная биология мембран клеток/ А. Камкин, И. Киселева. – М.: Academia, 2008. – 592 с.

15. de Galan B. E. Lowering blood pressure reduces renal events in type 2 diabetes / B.E. de Galan, V. Perkovic, T. Ninomiya // J. Am. Soc. Nephrol. – 2009. – Vol. 20, no. 4. – P. 883–892.

16. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины / Т. Гринхальх. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 330 с.