

**ЕСТЬ ЛИ РАЗЛИЧИЯ В ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРАХ КРОВИ,
СВЯЗАННЫЕ СО СТЕПЕНЬЮ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ?****М.В. Кручинина¹, А.А. Громов¹, А.В. Рабко¹, В.А. Баум¹, В.М. Генералов²,
В.Н. Кручинин³, С.В. Рыхлицкий³, В.А. Володин³**¹ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1²ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
633159, Новосибирская обл., пос. Кольцово³Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

Исследованы электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, оптические показатели сыворотки крови у пациентов с артериальной гипертензией I и II степени. Установлено нарастание отклонений в оптических характеристиках компонентов крови по мере увеличения степени артериальной гипертензии. Выявлены корреляции параметров эритроцитов с биохимическими показателями, отражающими гиперлипидемию, микроальбуминурию, наличие воспаления. Отмечено, что скорость поступательного движения эритроцитов к электродам, величина дипольного момента могут являться маркерами начальных стадий эндотелиальной дисфункции. Высказано предположение, что снижение деформабельности, поверхностного заряда эритроцитов является существенным патогенетическим фактором прогрессирования артериальной гипертензии, поэтому требует дополнительных акцентов в терапии. Выявленные взаимосвязи между параметрами эритроцитов и оптическими показателями сыворотки крови подтверждают факт взаимодействия между их компонентами и предполагают потребность комплексного лечения артериальной гипертензии.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, степень, эритроциты, электрические и вязкоупругие параметры, диэлектрофорез, оптические параметры сыворотки крови, эллисометрия, Raman-спектроскопия

В последнее десятилетие патофизиология микроциркуляции стала активно развивающейся областью исследований по артериальной гипертензии (АГ). Нередко авторы задают вопрос: не является ли гипертензия болезнью микроциркуляции? [1]. Подобный вопрос не лишен

основания, поскольку именно на этом уровне реализуется механизм сужения просвета артериол, переходя из стадии активной миогенной вазоконстрикции в стадию автотрофного внутреннего ремоделирования стенок сосудов. Кроме того, во многих экспериментальных и

Кручинина Маргарита Витальевна — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: kguchmargo@yandex.ru

Громов Андрей Александрович — канд. мед. наук, старший научный сотрудник, рук. группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: gromovcenter@rambler.ru

Рабко Анна Владимировна — врач-кардиолог поликлинического отделения, e-mail: annarabko@yandex.ru

Баум Владимир Арвидович — научный сотрудник группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: baumsv@mail.ru

Генералов Владимир Михайлович — д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией биофизического анализа, e-mail: vmgeneral@mail.ru

Кручинин Владимир Николаевич — канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории эллисометрии, e-mail: vladd50@mail.ru

Рыхлицкий Сергей Владимирович — канд. хим. наук, зав. лабораторией эллисометрии, e-mail: rhl@isp.nsc.ru

Володин Владимир Алексеевич — канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории неравновесных полупроводниковых систем, e-mail: volodin@isp.nsc.ru

© Кручинина М.В., Громов А.А., Рабко А.В., Баум В.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Володин В.А., 2014

клинических исследованиях по гипертензии выявляют микрососудистое разрежение, определяемое как снижение пространственной плотности микрососудистых сетей, причем подобные находки обнаружены у нормотензивных людей с наследственной предрасположенностью к АГ [2]. Возможно, наблюдаемое разрежение способствует повышению периферического сосудистого сопротивления при гипертонической болезни. Наконец, именно на микроциркуляторном уровне реализуются вазодилатирующие эффекты NO, что напрямую связано с функцией эндотелия [3], а капилляры состоят исключительно из эндотелиальных клеток. Именно на уровне микроциркуляторного русла выполняют свою функцию эритроциты, и изменение их электрических и вязкоупругих параметров, несомненно, скажется на прогрессировании и даже развитии артериальной гипертензии. Более того, в исследованиях Г.Г. Гогина и соавт. (2006) было показано, что изменение пластичности клеток красной крови происходит за несколько лет до регистрации повышенного артериального давления (АД) [4]. Поэтому авторы предположили первичность изменения эритроцитов с последующими компенсаторными гемодинамическими изменениями, включающими повышение АД, для продвижения «жестких» клеток в микроциркуляторном русле.

Известно, что между эритроцитами и компонентами сыворотки крови происходит постоянное взаимодействие, которое сказывается на свойствах клеток красной крови [5–7].

Данные предшествующих исследований оптических параметров эритроцитов и сыворотки крови позволили получить пилотные результаты, обнадеживающие в отношении определения стадии заболевания, в частности, при диффузной патологии печени [8, 9].

Цель работы – изучить особенности вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов с помощью электрооптической системы детекции клеток, оптических параметров сыворотки у пациентов с артериальной гипертензией 1-й и 2-й степени выраженности для выявления некоторых патогенетических особенностей развития заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 48 мужчин с артериальной гипертензией в возрасте 52 ± 8 лет, которые были разделены на две группы в зависимости от степени повышения артериального давления. Диагноз был верифицирован на основании клинического, биохимического и инструментальных исследований, включая ультрасонографическое,

и устанавливался в соответствии с Российскими рекомендациями ВНОК 2010 г. (четвертый пересмотр) [10]. Первую группу составили 28 пациентов (58 %) с АГ 1-й степени (систолическое артериальное давление (САД) 140–159 мм рт. ст. и/или диастолическое артериальное давление (ДАД) 90–99 мм рт. ст.); вторую группу – 20 пациентов (42 %) с АГ 2-й степени (САД 160–179 мм рт. ст. и/или ДАД 91–109 мм рт. ст.). В третью группу (группу сравнения) вошли 29 практически здоровых мужчин в возрасте от 35 до 60 лет (средний возраст 47 ± 5 лет). Критериями включения в группу сравнения являлись: АД на плечевой артерии менее 140/90 мм рт. ст., отсутствие заболеваний сердечно-сосудистой системы и других заболеваний, которые могут оказать отрицательное воздействие на сердце и сосуды.

Факторы риска были выявлены у 95 % пациентов: дислипидемия ПА, ПВ и IV типов – у 82,3 % больных, семейный анамнез ранних сердечно-сосудистых заболеваний – у 58,3 %, избыточный вес – у 48,3 %, ожирение – у 33,7 %, глюкоза плазмы крови натощак более 5,6–6,9 ммоль/л (102–125 мг/дл) – у 22,7 %, курение – у 22,9 % (при этом ранее (от 3 до 6 лет) курили 12,5 % больных), нарушенная толерантность к глюкозе обнаружилась у 13,4 %. Поражение органов-мишеней было выявлено у 48 % пациентов: гипертрофия левого желудочка – у 39,5 %, УЗИ-признаки атеросклеротических бляшек магистральных сосудов – у 18,8 %, снижение скорости клубочковой фильтрации – у 15,4 % (низкая скорость клубочковой фильтрации СКФ < 60 мл/мин/1,73м² (MDRD формула) или низкий клиренс креатинина < 60 мл/мин (формула Кокрофта–Голта)), повышение уровня креатинина более 107–124 мкмоль/л (1,2–1,4 мг/дл) – у 4,6 %. У 22 пациентов выявлена микроальбуминурия (от 30 до 300 мг экскреция альбумина с мочой за сутки). Антигипертензивные средства принимали 78 % больных, в том числе 64,3 % пациентов с АГ 1-й степени и 95 % пациентов с АГ 2-й степени (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), бета-блокаторы, блокаторы медленных кальциевых каналов).

Клинико-инструментальная характеристика групп представлена в табл. 1. Из данных таблицы следует, что 1-я и 2-я группы достоверно не различались по полу, возрасту, длительности артериальной гипертензии, основным факторам риска, за исключением уровня общего холестерина.

Стратификация риска пациентов с АГ представлена в табл. 2. Из нее видно, что во второй

Таблица 1

Клинико-инструментальная характеристика групп обследуемых

Показатель	1-я группа (АГ 1-й степени), <i>n</i> = 28	2-я группа (АГ 2-й степени), <i>n</i> = 20	Группа сравнения, <i>n</i> = 29
Возраст, годы	49 ± 7	55 ± 6	47 ± 5
САД, мм рт. ст.	142,1 ± 7,5	164,5 ± 8,1*	120,9 ± 8,2 *^^
ДАД, мм рт. ст.	93,4 ± 4,3	98,9 ± 6,1	75,1 ± 5,2 ***^^
ЧСС, уд./мин	72,5 ± 4,9	64,7 ± 5,4	75,3 ± 4,3
ИМТ, кг/м ²	25,8 ± 2,1	26,1 ± 1,9	24,2 ± 1,3
Курильщики, <i>n</i> (%)	5 (17,9 %)	6 (30 %)	2 (6,9 %)
Семейный анамнез ранних сердечно-сосудистых заболеваний, <i>n</i> (%)	12 (42,9 %)	16 (80 %)	3 (10,3 %)
Общий холестерин, ммоль/л	5,97 ± 0,24	6,41 ± 0,29	4,70 ± 0,39 ***^^
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	3,55 ± 0,27	3,72 ± 0,30	2,91 ± 0,35^
Триглицериды, ммоль/л	2,24 ± 0,36	2,56 ± 0,43	1,52 ± 0,61
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	5,1 ± 0,8	6,2 ± 1,2	4,5 ± 1,1
Признаки гипертрофии левого желудочка (индекс Соколова–Лайона >38 мм и/или ИММЛЖ ≥125 г/м ²), <i>n</i> (%)	7 (25 %)	12 (60 %)	–
УЗ-признаки утолщения стенки артерии (ТИМ более 0,9 мм) или атеросклеротические бляшки магистральных сосудов, <i>n</i> (%)	4 (14,3 %)	5 (25 %)	–
Микроальбуминурия 30–300 мг/сут, <i>n</i> (%)	10 (35,7 %)	12 (60 %)	–
Прием гипотензивных препаратов, <i>n</i> (%)	18 (64,3 %)	19 (95 %)	–
Продолжительность АГ, годы	6,1 ± 2,3	11,8 ± 3,4	–

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

^ – достоверность (*p*) отличия от 2-й группы (^ – *p* < 0,05, ^^ – *p* < 0,001).

ЧСС – частота сердечных сокращений; ИМТ – индекс массы тела; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка; ТИМ – толщина интима-медиа.

группе не было пациентов с низким дополнительным риском, чаще встречался высокий дополнительный риск.

Исследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в обследовании. У больных с артериальной гипертензией, а также у мужчин группы сравнения исследовали электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза (ДЭФ) [11] в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) с помощью автоматизированной специализированной установки электрооптической системы детекции клеток [12].

Оценивали электропроводность мембран, индексы агрегации и деструкции эритроцитов, емкость мембран клеток, скорость движения эритроцитов к электродам, положение равно-

весной частоты, амплитуду деформации эритроцитов, поляризуемость клеток, обобщенные показатели вязкости и жесткости, величины индуцированного дипольного момента.

Оптические параметры сыворотки крови исследованы методами спектральной и отображающей эллипсометрии, спектроскопии комбинационного рассеяния света (Raman-spectroscopy). Эллипсометрическое исследование пленок из сыворотки крови предполагало получение эллипсометрических спектров $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$, которые измерялись с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771» (ИФП СО РАН) в диапазоне длин волн $\lambda = 250\text{--}1000$ нм, спектральное разрешение прибора составляло 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 с, угол падения луча света на образец составлял 70°. Raman-спектры жидких сывороток крови пациентов записывались с помощью спектрометра с тройным

Стратификация риска у больных АГ		
Дополнительный риск	1-я группа (АГ 1-й степени), <i>n</i> = 28	2-я группа (АГ 2-й степени), <i>n</i> = 20
Низкий, <i>n</i>	4 (нет ФР)	0
Средний, <i>n</i>	14 (1–2 ФР)	5 (1–2 ФР)
Высокий, <i>n</i>	10 (3 и более ФР, ПОМ, МС или СД)	15 (3 и более ФР, ПОМ, МС или СД)

Примечание. ФР – фактор риска; ПОМ – поражение органов-мишеней; МС – метаболический синдром; СД – сахарный диабет.

монохроматором Т64000 (HoriJobinYvon) при комнатной температуре [8, 9].

Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода – 7–12 %. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver.10. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (*M*) и стандартная ошибка среднего (*m*). Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна–Уитни, Колмогорова–Смирнова). Связи между признаками оценивали путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена (*r*). При оценке качественных признаков использовали критерий χ^2 . Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (*p*) принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, что эритроциты здоровых лиц на частотах $5 \cdot 10^5$ и 10^6 Гц обнаружили ярко выраженную способность к деформации (рис. 1, *a*). Они вытягивались и приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода. На частотах $5 \cdot 10^4$, 10^5 Гц деформации не наблюдалось, клетки отталкивались от электродов (отрицательный диэлектрофорез), единичные клетки под действием поля разрушались.

У больных с артериальной гипертензией взаимодействие эритроцитов с НПЭП было другим: амплитуда деформации (*m*) и скорость поступательного движения клеток (мкм/с) относительно электродов на высоких частотах $5 \cdot 10^5$ и 10^6 Гц были значительно ниже ($p < 0,01$) (рис. 1, *б*). Избыточный гемолиз клеток наблюдался как на

высоких (10^6 , $5 \cdot 10^5$ Гц) (рис. 1, *в*), так и на низких ($5 \cdot 10^4$, 10^5 Гц) частотах. Отмечалась также повышенная способность эритроцитов к образованию агрегатов крупных и средних размеров после перевода эритроцитов в раствор 0,3М сахарозы ($p < 0,02$) (рис. 1, *г*).

Выявлены различия в поведении эритроцитов, связанные со степенью АГ. Эритроциты пациентов с АГ 1-й степени после перевода в раствор сахарозы преимущественно имели дискоцитарную форму, 22±4 % клеток приобретали форму «спущенного мяча» или сфероцитарную. Уровень недискоцитарных форм у больных с

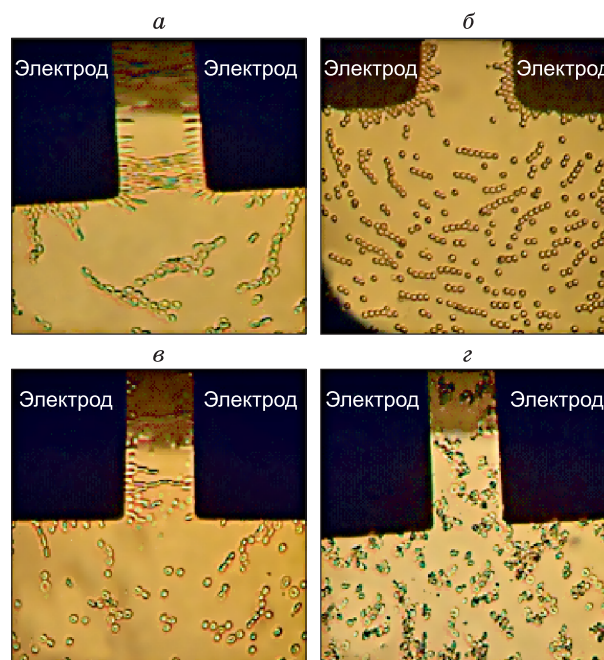


Рис. 1. Разделение и деформация эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля на частоте 1 МГц:

a – у лиц группы сравнения; *б* – у больных с артериальной гипертензией 2-й степени; *в* – повышенный гемолиз эритроцитов у больных с артериальной гипертензией; *г* – повышенное образование агрегатов у пациентов с артериальной гипертензией

Таблица 3

Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов у больных с артериальной гипертензией различной степени и в группе сравнения ($M \pm m$)

Показатель эритроцитов	1-я группа, больные с АГ 1-й степени, $n = 28$	2-я группа, больные с АГ 2-й степени, $n = 20$	3-я группа, сравнения, $n = 29$
Амплитуда деформации, м	$0,81 \cdot 10^{-6} \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$	$0,62 \cdot 10^{-6} \pm 0,22 \cdot 10^{-6}^*$	$2,7 \cdot 10^{-6} \pm 0,6 \cdot 10^{-6}^{***\wedge\wedge\wedge}$
Обобщенный показатель жесткости, Н/м	$6,1 \cdot 10^{-6} \pm 0,7 \cdot 10^{-7}$	$8,0 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}^*$	$4,4 \cdot 10^{-6} \pm 0,6 \cdot 10^{-6}^{***\wedge\wedge\wedge}$
Обобщенный показатель вязкости, Па·с	$0,58 \pm 0,11$	$0,75 \pm 0,09^*$	$0,31 \pm 0,04^{***\wedge\wedge\wedge}$
Индекс агрегации Ег, усл. ед.	$0,66 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,03^*$	$0,43 \pm 0,02^{***\wedge\wedge\wedge}$
Индекс деструкции Ег, %	$5,7 \pm 0,5$	$8,2 \pm 0,3^{***}$	$1,07 \pm 0,69^{***\wedge\wedge\wedge}$
Поляризуемость, м ³ , 10 ⁶ Гц	$0,71 \cdot 10^{-15} \pm 0,6 \cdot 10^{-15}$	$0,52 \cdot 10^{-15} \pm 0,5 \cdot 10^{-16}^*$	$5,8 \cdot 10^{-15} \pm 0,8 \cdot 10^{-15}^{***\wedge\wedge\wedge}$
Электропроводность, См/м	$6,1 \cdot 10^{-5} \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5}^{**}$	$2,8 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}^{***\wedge\wedge\wedge}$
Емкость клеточной мембраны, Ф	$5,1 \cdot 10^{-14} \pm 0,4 \cdot 10^{-14}$	$3,9 \cdot 10^{-14} \pm 0,2 \cdot 10^{-14}^{***}$	$7,2 \cdot 10^{-14} \pm 0,2 \cdot 10^{-14}^{***\wedge\wedge\wedge}$
Скорость движения Ег к электродам, мкм/с	$7,9 \pm 2,4$	$5,4 \pm 1,8$	$13,9 \pm 2,5^{\wedge\wedge}$
Равновесная частота, Гц	$6,2 \cdot 10^5 \pm 0,2 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^5 \pm 0,3 \cdot 10^5^{**}$	$4,7 \cdot 10^5 \pm 0,4 \cdot 10^5^{***\wedge\wedge\wedge}$
Дипольный момент, Кл·м	$0,52 \cdot 10^{-21} \pm 0,08 \cdot 10^{-21}$	$0,29 \cdot 10^{-21} \pm 0,07 \cdot 10^{-21}^*$	$1,5 \cdot 10^{-21} \pm 0,4 \cdot 10^{-21}^{\wedge\wedge}$

Примечание. M – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего;

* – достоверность (p) отличия от 1-й группы (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,02$, *** – $p < 0,001$);

^ – достоверность (p) отличия от 2-й группы (^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,02$, ^^ – $p < 0,0001$).

Величина дипольного момента рассчитывалась при напряженности электрического поля $8,85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м.

АГ 2-й степени возрастал до 47 ± 5 % ($p < 0,001$), кроме того, около трети дискоцитов становились шпиковидными. Для обеспечения целостности мембраны и двояковогнутой формы эритроцитов большое значение имеет энергия макроэргов [2]. Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза (и, прежде всего, ионного) в эритроцитах осуществляется за счет аденозинтрифосфата (АТФ), образующегося в процессе гликолиза, который является основным путем обмена энергии в красных клетках крови [13]. Истощение АТФ в эритроцитах приводит к ряду нарушений, в том числе к блокированию ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда–клетка. Это способствует снижению соотношения площади поверхности к объему эритроцитов и превращению клеток в труднодеформируемые сферы, появлению шпиковидных отростков, что, в свою очередь, затрудняет транспорт кислорода из эритроцита к тканям и усугубляет гипоксию, которая стимулирует явления фиброгенеза, приводящего к внутреннему ремоделированию стенок сосудов [7, 14].

По мере нарастания степени АГ показатели электропроводности, обобщенные показатели жесткости, вязкости, индексы агрегации, деструкции увеличивались, а амплитуда их де-

формации, поляризуемость мембран на частоте 10^6 Гц, скорость движения клеток к электродам, дипольный момент, электрическая емкость мембран эритроцитов достоверно уменьшались ($p < 0,001$ – $0,05$) (табл. 3). Получены обратные корреляции степени артериальной гипертензии с амплитудой деформации ($r = -0,623$; $p < 0,033$), прямые – с обобщенными показателями жесткости ($r = 0,502$; $p < 0,002$) и вязкости эритроцитов ($r = 0,474$; $p < 0,003$).

Известно, что способность эритроцита к деформации обусловлена его вязкоупругими свойствами [1, 7]. Снижение деформируемости эритроцитов, по данным нашего исследования, связано с повышением обобщенных показателей вязкости и жесткости клеток. Одной из возможных причин этого является увеличение уровня холестерина в мембране эритроцитов, соотношения холестерин/фосфолипиды. Известно, что между эритроцитами и адсорбированными на их поверхности липопротеидами происходит постоянный обмен холестерина [6]. В результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов увеличиваются их размеры, изменяется их форма с резким снижением их фильтрационной способности [15, 16]. В клинике все это может привести к затруднению

движения эритроцитов по микроциркуляторному руслу и нарушению процессов переноса кислорода, т.е. быть причиной возникновения ишемических состояний. Снижение амплитуды деформации клеток под действием НПЭП, нарастающее от 1-й ко 2-й степени артериальной гипертензии, является прообразом поведения эритроцитов в микроциркуляторном русле, на уровне капилляров, просвет которых в несколько раз меньше диаметра клеток. Ригидные эритроциты, склонные к образованию агрегатов, в таких обстоятельствах легко подвергаются гемолизу, а эритроцитарные агрегаты повреждают эндотелий сосудов [5].

Ухудшение деформируемости эритроцитов обуславливает развитие застойных явлений в микроциркуляторном русле и, как следствие, возникновение тканевой гипоксии [17]. В опытах на изолированном легком кролика показано, что пластичность клеток красной крови влияет на величину артериального давления в нем и легочный коэффициент диффузии кислорода [18]. Деформируемость эритроцитов за счет усиления конвекции их содержимого в большей степени способствует переносу кислорода, чем облегченная диффузия [19]. Высказано предположение о существовании уникального механизма контроля за сопротивлением легочных сосудов, согласно которому высвобождение АТФ из эритроцитов происходит в ответ на их механическую деформацию, обуславливая стимуляцию синтеза вазодилатора NO [20].

Показано, что эритроциты реагируют с NO, синтезированным и доставленным из эндотелиальных клеток [21]. Вместе с тем установлено, что эритроциты имеют собственную NO-синтазу для синтеза собственного NO, однако этот процесс реализуется при достаточной степени деформабельности эритроцитов [17]. Исходя из этих данных, пластичные клетки красной крови являются мощным эндогенным источником NO. Поэтому эритроциты со сниженной деформабельностью не обеспечивают достаточного уровня оксида азота с последующей вазодилатацией, а, следовательно, периферическое сопротивление будет нарастать, приводя к увеличению АД.

Повышенные индексы деструкции и агрегации коррелировали с низкими показателями поляризуемости клеток ($r = -0,67$, $p < 0,017$; $r = -0,63$, $p < 0,03$ соответственно). Снижение поляризуемости эритроцитов, отражающей биологическую активность клеток, вероятно, является отражением малоэффективного эритропоэза при артериальной гипертензии, нарастающего по мере прогрессирования степени заболевания.

Активация юкстагломерулярного аппарата почек, связанная с усилением сужения почечных артерий, приводит к повышению уровня эритропоэтина, являющегося стимулятором ускоренного синтеза эритроцитов [22]. Эритроциты в этом случае проходят не 10 стадий созревания, а только пять или семь с выбросом на периферию неполноценных клеток с мембранами, имеющими измененный состав поверхностных структур, в частности, с высоким уровнем карбоксильных групп, структурно-модифицированного спектрина, лизофракций фосфолипидов. Измененная поверхностная структура воспринимается иммунокомпетентными клетками как подлежащая извлечению из кровотока. Поэтому подобные клетки являются «короткоживущими», с признаками преждевременного старения, со склонностью к лизису. Следствием этого является нарастание пула эритроцитов со сниженной устойчивостью клеток к воздействию различных стрессовых факторов. Отсюда высокие уровни индекса деструкции на всех частотах и высокие уровни индекса агрегации, поскольку высвобождающийся при разрушении эритроцитов аденозиндифосфат (АДФ) является мощным индуктором образования агрегатов, в том числе и лейкоцитарно-тромбоцитарных [5]. Кроме того, процесс усиления агрегации эритроцитов сопровождается выделением агрегатами клеток тромбопластических веществ, связанных с клеточной мембраной, и созданием локального состояния гиперкоагуляции, способствующего внутрисосудистому свертыванию крови и вторичному нарушению гемодинамики в микроциркуляции [23].

Выявлены корреляции уровня микроальбуминурии с электрическими параметрами эритроцитов, а именно, со скоростью поступательного движения эритроцитов к электродам ($r = 0,57$; $p < 0,024$), величиной дипольного момента ($r = 0,68$; $p < 0,03$), которые отражают плотность и величину поверхностного отрицательного заряда эритроцитов. Диполь характеризует пространственную асимметрию распределения электрических зарядов по всему объему клетки. Исследование на микроальбуминурию традиционно используют для скрининга диабетической нефропатии. Однако в последнее время тест на микроальбуминурию стали рассматривать как показатель оценки функции плазматических мембран высокодифференцированных клеток, в том числе для оценки степени дисфункции эндотелия. В норме отрицательно заряженный альбумин не проходит через гломерулярный фильтр почек, прежде всего вследствие наличия высокого отрицательного заряда

на поверхности эндотелиальных клеток, подцитов. Этот заряд обусловлен структурой фосфолипидов клеточных мембран, богатых полиненасыщенными жирными кислотами, высоким уровнем сиалопротеинов. Снижение количества двойных связей в ацильных остатках фосфолипидов уменьшает отрицательный заряд, и альбумин начинает фильтроваться в первичную мочу в повышенном количестве. Все эти изменения возникают при развитии атеросклероза, поэтому микроальбуминурия развивается при наследственных формах гиперлипидемии, ишемической болезни сердца (ИБС), артериальной гипертензии, у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе. Изменения структуры фосфолипидов плазматических мембран высокодифференцированных клеток (в том числе эритроцитов, клеток почек, эндотелиоцитов) возникают при атеросклерозе и немедленно сказываются на заряде мембран. Становится понятной тесная связь электрических показателей эритроцитов и микроальбуминурии, которые, возможно, являются маркерами начальных стадий эндотелиальной дисфункции, одного из ведущих звеньев патогенеза артериальной гипертензии [24].

Таким образом, установлено, что наличие артериальной гипертензии сопряжено с явлением деполяризации эритроцитов, при этом амплитудно-частотные характеристики клетки в НПЭП являются хорошим индикатором физико-химических свойств ее мембраны и цитоплазмы, а также отражают состояние ее биологической активности.

У пациентов с артериальной гипертензией достоверно чаще ($p < 0,01$) наблюдалось смещение равновесной частоты в более высокие частоты (более $5 \cdot 10^5$ Гц) (см. табл. 3), причем подобные сдвиги были выявлены уже при небольших эпизодических подъемах артериального давления. Смещение равновесной частоты в высокочастотную область у больных с АГ, очевидно, свидетельствует о повышенной электропроводности эритроцитов. Измененная электропроводность отражает степень структурных изменений в мембранах: увеличение содержания холестерина в мембранах вызывает возрастание обобщенных вязкости, жесткости эритроцита, нарушает латеральную диффузию рецепторов, проницаемость для растворенных веществ, ионный транспорт, приводя к повышению электропроводности мембраны [25].

У пациентов с АГ по мере нарастания уровня артериального давления отмечено снижение величин электрической емкости мембран ($p < 0,0001$). Сдвиги этого показателя могут указывать на изменение толщины мембраны. Снижение емкости клеточной мембраны у па-

циентов свидетельствует об утолщении мембран клеток красной крови. В изменение этого показателя у пациентов с АГ, вероятно, вносят вклад различные факторы. Это и усиление обмена сывороточными липидами, подтверждаемое обратными связями емкости мембран эритроцитов с уровнем общего холестерина ($r = -0,57$; $p < 0,048$), триглицеридов ($r = -0,46$; $p < 0,033$), и адсорбция повышенных уровней глобулинов ($r = -0,37$; $p < 0,05$), фибриногена ($r = -0,42$; $p < 0,04$).

Сниженные показатели дипольного момента у всех пациентов с АГ достигали минимальных значений при стабильно более высоких цифрах артериального давления (см. табл. 3), что свидетельствует о снижении индуцированного электрического заряда эритроцитов. Подобные изменения могут быть объяснены рядом причин. Во-первых, известно, что при АГ изменяется средний корпускулярный объем эритроци-

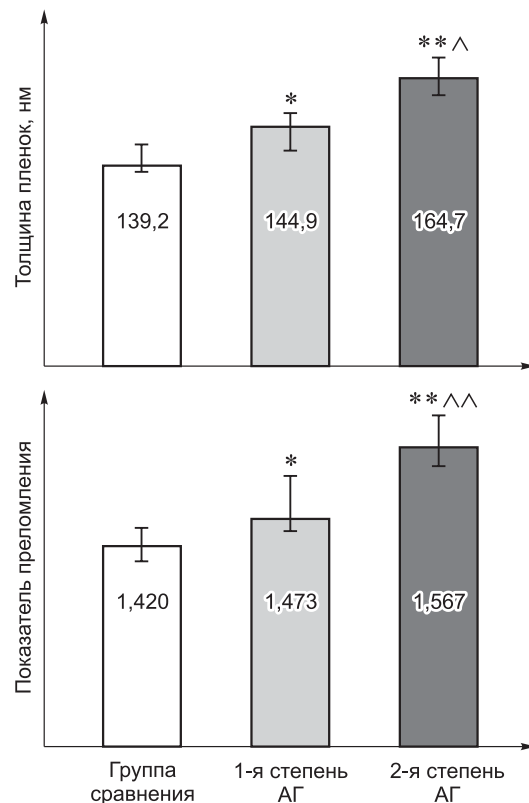


Рис. 2. Эллипсометрические показатели (эффективные значения толщины пленок и показателя преломления при $\lambda = 632,8$ нм) у пациентов с различной степенью артериальной гипертензии и в группе сравнения.

* — достоверность различий от группы сравнения:
* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$;

^ — достоверность различий от группы больных АГ 1-й степени: ^ — $p < 0,05$; ^^ — $p < 0,001$

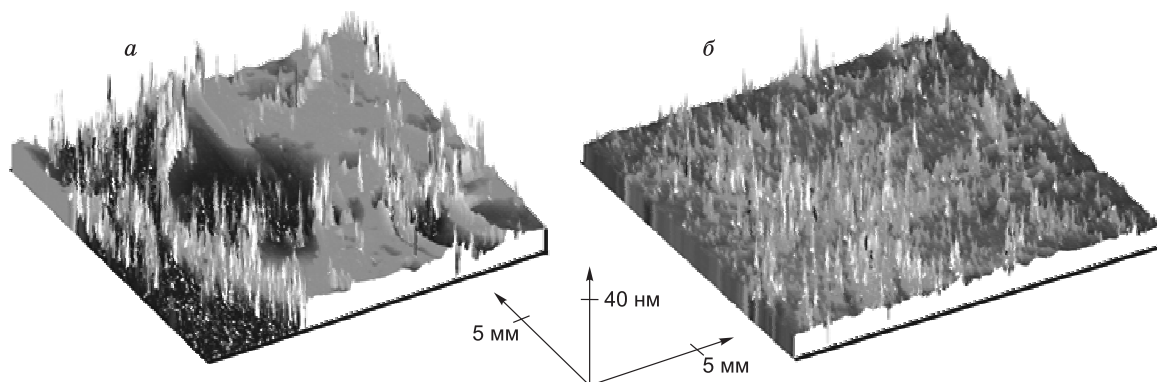


Рис. 3. Трехмерное распределение толщин тонких пленок по поверхности пластин, приготовленных из сывороток крови пациента с АГ 2-й (а) и 1-й (б) степени

тов, что приводит к снижению плотности поверхностного заряда за счет перераспределения гликопротеинов и гликолипидов мембран по поверхности клетки [5, 7]. Во-вторых, в мембранах эритроцитов происходит уменьшение абсолютного содержания сиаловых и нейраминной кислот (плотность поверхностного заряда на 60 % определяется их содержанием) [5, 15]. В-третьих, повышение уровня глобулинов сыворотки крови, фибриногена, фибрина сопровождается их адсорбцией на поверхности эритроцитов, приводя к снижению электрического заряда клеток и усилению их склонности к агрегации.

Исследование эллипсометрических показателей тонких пленок, полученных из сывороток крови пациентов с артериальной гипертензией, позволило установить факт достоверного увеличения показателя преломления и эффективной толщины пленки по мере нарастания степени артериальной гипертензии ($p < 0,001-0,05$) (рис. 2).

Исследование однородности поверхности пленок из сывороток крови с помощью сканирующего эллипсометра высокого разрешения «Микроскан» показало, что пленки больного с АГ 2-й степени неравномерны по толщине, имеют большие разрывы по сравнению с таковыми у пациентов с АГ 1-й степени ($p < 0,05$) (рис. 3).

Подобные изменения могут быть связаны с повышением уровня компонентов липидного профиля, ряда крупномолекулярных белков у пациентов с АГ 2-й степени по сравнению с 1-й степенью заболевания (в том числе общего холестерина, триглицеридов, фибриногена и др.), которые являются определяющими для эффективной толщины пленки (корреляции для уровня общего холестерина $r = 0,62$, $p < 0,001$; триглицеридов — $r = 0,49$, $p < 0,01$;

фибриногена — $r = 0,54$, $p < 0,03$). Преобладание неравномерных пленок при АГ 2-й степени, очевидно, связано с большей выраженностью биохимического дисбаланса в сыворотке крови. Показатель преломления определялся в большей степени уровнем глюкозы, креатинина, а также компонентами синдрома цитолиза, которые нарастали по мере увеличения степени АГ (с учетом факторов риска, поражения органов мишеней). Корреляции показателя преломления с уровнями глюкозы составили $r = 0,58$; $p < 0,03$, креатинина — $r = 0,45$; $p < 0,04$, с активностью аланинаминотрансферазы (АЛТ) — $r = 0,41$; $p < 0,02$, с активностью аспартатаминотрансферазы (АСТ) — $r = 0,39$, $p < 0,05$.

В спектрах комбинационного рассеяния света образцов жидких сывороток крови в области $750-1750 \text{ см}^{-1}$ интенсивности трех характерных пиков поглощения при 1005 , 1157 , 1520 см^{-1} оказались достоверно ниже у пациентов с АГ 2-й степени по сравнению с АГ 1-й степени ($p < 0,001-0,01$) (табл. 4), что может быть связано со степенью дислипидотеинемии.

Выявлены ассоциации между электрическими и вязкоупругими параметрами эритроцитов и оптическими показателями сыворотки крови. Установлены обратные корреляции эффективной толщины пленки с амплитудой деформации эритроцитов ($r = -0,56$; $p < 0,01$), поляризуемостью на высоких частотах ($r = -0,62$; $p < 0,03$ для 1 МГц ; $r = -0,55$; $p < 0,04$ для $0,5 \text{ МГц}$) и прямые — с обобщенными показателями вязкости ($r = 0,54$; $p < 0,05$), жесткости ($r = 0,42$; $p < 0,03$), электропроводностью ($r = 0,62$; $p < 0,02$). Показатель преломления прямо коррелировал с электропроводностью ($r = 0,58$; $p < 0,04$), индексами деструкции ($r = 0,44$; $p < 0,01$), агрегации ($r = 0,48$; $p < 0,02$) и был обратно связан с емкостью мембран эритроцитов ($r = -0,40$; $p < 0,05$),

Площадь пиков комбинационного рассеяния света у больных с артериальной гипертензией различной степени ($M \pm m$)

Положение пика, см ⁻¹	Площадь пика, усл. ед.		p
	Группа больных с АГ 1-й степени	Группа больных с АГ 2-й степени	
1005	811 ± 103	427 ± 93	<0,01
1157	2342 ± 358	994 ± 128	<0,0036
1520	2874 ± 197	806 ± 159	<0,001

величиной дипольного момента ($r = -0,51$; $p < 0,03$), амплитудой деформации клеток ($r = -0,55$; $p < 0,05$). Выявленные взаимосвязи между параметрами эритроцитов и оптическими показателями сыворотки крови подтверждают факт взаимодействия, обмена между их компонентами и предполагают потребность комплексной терапии артериальной гипертензии.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с артериальной гипертензией эритроциты имели достоверно более низкие показатели амплитуды деформации, поляризуемости, емкости мембран, дипольного момента и более высокие показатели обобщенных вязкости, жесткости, электропроводности, индексов деструкции, агрегации, эффективной толщины, показателя преломления тонких пленок, полученных из сыворотки, по сравнению со здоровыми обследуемыми.

2. По мере перехода от 1-й ко 2-й степени артериальной гипертензии амплитуда деформации, поляризуемость, емкость мембран, величина дипольного момента, интенсивности пиков поглощения Raman-спектров сыворотки крови при 1005, 1157, 1520 см⁻¹ достоверно снижались, а показатели обобщенных вязкости, жесткости, электропроводности, индексов деструкции, агрегации, эффективная толщина, показатель преломления тонких пленок, полученных из сыворотки, достоверно повышались.

3. Выявлены корреляции скорости поступательного движения эритроцитов к электродам, величины дипольного момента с уровнем микроальбуминурии, электрической емкости мембран эритроцитов — с уровнями общего холестерина, триглицеридов, фибриногена, глобулинов.

4. Скорость поступательного движения эритроцитов к электродам, величина дипольного момента, возможно, являются маркерами начальных стадий эндотелиальной дисфункции.

5. Снижение деформальности, поверхностного заряда эритроцитов, вероятно, является существенным патогенетическим фактором прогрессирования артериальной гипертензии, поэтому требует дополнительных акцентов в терапии данного заболевания.

6. Выявленные взаимосвязи между электрическими, вязкоупругими параметрами эритроцитов и оптическими параметрами сыворотки крови предполагают необходимость комплексной терапии артериальной гипертензии.

ЛИТЕРАТУРА

- Engelhardt H., Gaub H., Sackmann E. Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields // Nature (London). 1984. Vol. 307, N 5949. P. 378–380.
- Kawakami S., Kaibara M., Kawamoto Y., Yamanaka K. Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelialcellcoated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface // Biorheology. 1995. Vol. 32, N 5. P. 521–536.
- Kreuzer F., Hoofd L. Facilitated diffusion of oxygen: possible significance in blood and muscle // Oxygen Transp. Tissue 5: Proc. Meet. Dortmund. 1982. P. 3–21.
- Гогин Г.Г., Гогин Е.Г. Гипертоническая болезнь и ассоциированные болезни системы кровообращения: основы патогенеза, динамика и выбор лечения. М.: Ньюдиамед, 2006. 254 с.
- Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Изд-во «Триада-Х», 1997. 480 с.
- Леонова Т.Я. К вопросу об эритроцитарном механизме регулирования холестерина при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1982. 22 с.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
- Воевода М.И., Пельтек С.Е., Кручинина М.В., Курялович С.А., Кручинин В.Н., Могильников К.П., Рыхлицкий С.В. Исследование тонких пленок, полученных центрифугированием сыворотки крови человека, методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии // Автометрия. 2010. Т. 46, № 4. С. 106–120.
- Kruchinina M., Voevoda M., Peltek S., Kurilovich S., Gromov A., Kruchinin V., Rykhlytsky S., Volodin V., Generalov V. Application of optical methods in blood studies upon evaluation of severity rate of diffuse liver pathology // J. Anal. Sci. Methods Instrument. 2013. Vol. 3, N 2. P. 115–123.
- Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации ВНОК (четвертый пе-

- ресмотр). Москва, 2010 г. // Системные гипертензии. 2010. № 3. С. 5–26.
11. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Громов А.А., Бакиров Т.С., Генералов В.М., Пак А.В. Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов при различной степени фиброза печени // Вестн. НГУ. 2005. Т. 3, вып. 4. С. 43–52.
 12. Генералов В.М., Бакиров Т.С., Пак А.В., Звольский И.Л., Зайцев Б.Н., Дурьманов А.Г., Кручинина М.В., Курилович С.А., Сергеев А.Н. Автоматизированная установка измерения вязкоупругих характеристик эритроцитов // Научные технологии. 2008. Т. 9, № 12. С. 28–33.
 13. Бойтлер Э. Нарушения метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. М.: Медицина, 1981. 256 с.
 14. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006. 553 с.
 15. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981. 215 с.
 16. Banerjee R., Nageshwari K., Puniyani R.R. The diagnostic relevance of red cell rigidity // Clin. Hemorheol. Microcirc. 1988. Vol. 19, N 1. P. 21–24.
 17. Feihl F., Liauder L., Waeber V., Levy B.I. Hypertension – a disease of the microcirculation? // Hypertension. 2006. N 48. P. 1012–1017.
 18. Betticher D.C., Reinhart W.H., Geiser J. Effect of RBC shape and deformability on pulmonary O₂ diffusing capacity and resistance to flow in rabbit lungs // J. Appl. Physiol. 1995. Vol. 78, N 3. P. 778–783.
 19. Jubelin B.C., Gierman J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide // Am. J. Hypertens. 1996. Vol. 9. P. 1214–1219.
 20. Noon J.P., Walker B.R., Webb D.J., Shore A.C., Holton D.W., Edwards H.V., Watt G.C. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure // J. Clin. Invest. 1997. Vol. 99. P. 1873–1879.
 21. Chen L.Y., Mehta J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998. Vol. 32. P. 57–61.
 22. Мельников А.А., Викулов А.Д. Реологические свойства крови у спортсменов. Ярославль: Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2008. 491 с.
 23. Ikuchi Y., Da Q.W., Fujino T. Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue // Microvasc. Res. 1994. Vol. 47, N 2. P. 222–231.
 24. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 800 с.
 25. Болис Л., Хоффман Д.Ф., Лиф А. Мембраны и болезнь. М.: Медицина, 1980. 408 с.

ARE THERE ANY DIFFERENCES IN OPTICAL PROPERTIES OF BLOOD, ASSOCIATED WITH THE DEGREE OF ARTERIAL HYPERTENSION?

M.V. Kruchinina¹, A.A. Gromov¹, A.V. Rabko¹, V.A. Baum¹, V.M. Generalov², V.N. Kruchinin³, S.V. Rykhliitsky³, V.A. Volodin³

¹ Institute of Internal and Preventive Medicine of SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

² State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»
633159, Novosibirsk, Koltsovo

³ Institute of semiconductor physics n.a. A.V. Rzhanov of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academic Lavrent'ev av., 13

We investigated the electrical and viscoelastic parameters of red blood cells, optical parameters of blood serum in patients with hypertension of I and II degree. We marked the increase of variations in the optical characteristics of blood components with an increase in the degree of hypertension. We identified the correlations of erythrocytes parameters with biochemical indicators reflecting hyperlipidemia, microalbuminuria and the presence of inflammation. It was noted that the velocity of red blood cells to the electrodes, the dipole moment can be the markers of initial stages of endothelial dysfunction. It was suggested that the decrease of deformability, surface charge of red blood cells are the important pathogenetic factors in the progression of hypertension, therefore, requires additional emphasis in the treatment of this disease. The identified relationships between the optical parameters of erythrocytes and serum indicators confirm the interaction between their components, and require complex treatment of hypertension.

Keywords: hypertension, degree, erythrocytes, electrical and viscoelastic parameters, dielectrophoresis, the optical parameters of blood serum, ellipsometry, Raman-spectroscopy.

Статья поступила 15 февраля 2014 г.