

РАМАН-СПЕКТРОСКОПИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ДИАГНОСТИКЕ
РЕЗИСТЕНТНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

М.В. Кручинина¹ Я.Ш. Шварц¹, А.А. Громов¹,
В.Н. Кручинин², В.А. Володин^{2,3}, С.В. Рыхлицкий²

¹ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины»
630089 Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

²ФГБНУ «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова» СО РАН
630090 Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13

³Новосибирский государственный университет
630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

С помощью Раман-спектроскопии изучено изменение содержания комплексов гемоглобина у пациентов с артериальной гипертензией (42 мужчины), в том числе, резистентной (19 человек).

Выявлено достоверное снижение уровня комплексов Hb-NO (II) у пациентов с РАГ по сравнению с таковыми у больных с контролируемой АГ и у здоровых. Определены дискриминирующие значения уровней пиков Раман комплексов гемоглобина у пациентов с артериальной гипертензией (в том числе, резистентной) и в группе сравнения.

Установлены наиболее значимые пики Раман-спектров гемоглобина, уровни которых позволяют дифференцировать контролируемую и резистентную артериальную гипертензию – 1325, 1350, 1550, 1580, 1660, 1668 см⁻¹ (AUC – 0,680–0,805).

Оценена возможность применения данных параметров в диагностических целях.

Ключевые слова: Раман-спектроскопия, гемоглобин, резистентная артериальная гипертензия, диагностики

Кручинина Маргарита Витальевна – д. м. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория гастроэнтерологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1;

к. т. 8-913-728-17-02, E-mail: kruchmargo@yandex.ru

Шварц Яков Шмульевич – д. м. н., заведующий лабораторией молекулярно-клеточных механизмов терапевтических заболеваний исследований ХНИЗ, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1;

к. т., E-mail: yshschwartz@mail.ru

Громов Андрей Александрович – к. м. н., старший научный сотрудник, руководитель группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1;

к. т. 8-913-451-27-20, E-mail: gromovcenter@rambler.ru

Кручинин Владимир Николаевич – к. х. н., научный сотрудник, лаборатория эллипсометрии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева 13;

к. т. 8-913-951-39-31, E-mail: vladd.kruch@yandex.ru

Володин Владимир Алексеевич – к. ф.-м. н., старший научный сотрудник, лаборатория неравновесных полупроводниковых систем, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН, 630090, просп. Акад. Лаврентьева 13; заведующий лабораторией Оптических методов исследования наноструктурированных материалов, Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

к. т. 8-913-753-54-05, E-mail: volodin@isp.nsc.ru

Рыхлицкий Сергей Владимирович – к. х. н., заведующий лабораторией эллипсометрии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН, 630090, пр. Акад. Лаврентьева 13;

к. т. 8-913-916-45-26, E-mail: rhl@isp.nsc.ru

© Кручинина М.В., Шварц Я.Ш., Громов А.А., Кручинин В.Н., Володин В.А., Рыхлицкий С.В., 2016

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы диагностики и терапевтической тактики у пациентов с резистентной артериальной гипертензией является весьма актуальными в связи высокой распространенностью (она составляет 3–24% среди пациентов, получающих антигипертензивную терапию [1, 2]), неясностью механизмов возникновения рефрактерности [3], роли различных факторов — эндотелия [4], регуляторных цитокинов, иммунологических компонентов, клеток крови, влияющих на развитие РАГ.

Одним из возможных патогенетических факторов развития резистентной АГ является нарушение биодоступности эритроцит-производного оксида азота (NO) [5]. Известно о трех основных источниках NO, два из которых связаны с эритроцитами, а именно: S-нитрозотиолы из гемоглобина и NO, производимый с помощью нитритредуктазы гемоглобина [6]. Аспект взаимоотношений эритроцитов и NO у пациентов с РАГ является весьма перспективным с точки зрения возможностей вмешательства в метаболизм NO [7-9].

Современные подходы к диагностике резистентной артериальной гипертензии предполагают использование целого комплекса исследований для исключения псевдорезистентной АГ, факторов, способствующих резистентности к антигипертензивной терапии, вторичной АГ, ассоциированных состояний (метаболический синдром, ожирение, курение, алкоголь), генетических особенностей [2, 10]. Однако, при сохранении резистентности после исключения вышеописанных факторов, на первое место выходят возможные патогенетические нарушения, в том числе, выявление уровня оксида азота.

В клинической практике используется «Способ коррекции эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса пациента» (патент РФ № 2170102, МКИА61К38/55, G01N33/48, А61М16/00, А61Р9/12), который позволяет выявить дефицит оксида азота в биологических жидкостях с использованием гипоксического теста. Данный способ заключается в определении содержания нитратов и нитритов в биологических жидкостях пациента до и после интервально-гипоксической тренировки.

Недостатком данного метода является условие его использования у лиц без тяжелой патологии, так как гипоксия может усугубить течение заболевания. Другими недостатками являются приносящее неудобства пациенту трудо- и время-затратное проведение тренировки, а также оценка интегральной сосудистой, а не эритроцитарной дисфункции.

Известна другая технология — «Способ оценки способности эндотелия сосудистой стенки к продукции и секреции монооксида азота» (патент РФ № 2157089, МКИА61В5/021, G01N33/84). Способ заключается в определении содержания оксида азота

в крови пациента и в контрольной группе до и после компрессии кровеносных сосудов конечности (создание очага кратковременной локальной ишемии) и вычисления разности полученных величин у пациента в сравнении с данными в контрольной группе, по которой судят о способности эндотелия сосудистой стенки к продукции и секреции оксида азота.

Недостатками вышеописанной технологии являются необходимость специальной работы с пациентом, сложность и неудобство для него процедуры проведения компрессионных манипуляций и невозможность оценки эритроцитарной NO-генерирующей функции/дисфункции.

В экспериментальных исследованиях применяется метод прямого планшетного измерения генерации оксида азота гипоксичными эритроцитами в проточном микрожидкостном устройстве [11]. Метод осуществлялся на эритроцитах кроликов, полученных путем трехкратного осаждения в центрифуге и отмывания в физиологическом растворе с последующим помещением клеток в буфер, содержащий кислород-поглощающий фермент оксидазу (Oxygase Inc. Mansfield, OH).

Недостатками данного подхода являются невозможность его клинико-лабораторного использования из-за необходимости применения сложного технического обеспечения в виде устройства, пока существующего в единственном экспериментальном варианте, сложной пробоподготовки эритроцитов и использования дорогостоящего гипоксичного буфера.

Проведенные в «НИИТПМ» пилотные исследования по выявлению патогенетических особенностей резистентной артериальной гипертензии позволили доказать перспективность подхода, связанного с оценкой уровня комплексов гемоглобина, для диагностики данной патологии [12].

В связи с вышеизложенной информацией, в данной работе определяется содержание комплексов гемоглобина эритроцитов у пациентов с артериальной гипертензией, в том числе, резистентной для выявления возможностей диагностики данного заболевания. Для этой цели использован современный физико-химический метод исследования биологических сред — спектроскопия комбинационного рассеяния света (Раман-спектроскопия). Данный метод обладает рядом достоинств, важных для исследования биологических объектов — это, прежде всего, высокая чувствительность как при измерении низких концентраций биоорганических соединений в растворах, так и при нанесении этих растворов в виде тонких пленок на твердые подложки. Во-вторых, неразрушающий характер воздействия на биообъекты, многие из которых обладают сложной структурой. В-третьих, высокая оперативность измерений, для проведения которых не требуется

создания особых условий (высокого вакуума, нагрева или охлаждения исследуемого образца, специальных ионизирующих излучений, использования флуоресцентных меток) [13, 14].

Использование данного подхода в клинической практике позволит сократить материальные, временные, трудовые затраты на диагностику и лечение АГ и ее последствий.

Цель исследования: изучить изменения содержания комплексов гемоглобина методом Raman-спектроскопии у пациентов с артериальной гипертензией (в том числе, резистентной), оценить возможность применения данных параметров в диагностических целях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 42 мужчины (53±7 лет) с артериальной гипертензией (АГ) 2 стадии, у 19 из них выявлена резистентная АГ (РАГ) [10]. Проанализированы отдельно пациенты с контролируемой АГ (23 человека – 1 группа), с резистентной АГ (19 человек – 2 группа). Группа сравнения состояла из 23 мужчин сопоставимого возраста (50±8 лет) без АГ и какой-либо другой манифестирующей патологии внутренних органов.

Критериями включения в исследование явились: 1. Мужчины 40–60 лет с гипертонической болезнью II стадии или без нее. 2. Подписание информированного согласия на участие в исследовании.

Обследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики «НИИТПМ» (заседание от 18.12.2015).

Пациентам было проведено комплексное клиническое, инструментально-лабораторное обследование, включая ЭКГ, УЗИ сердца, КТ, ЭЭГ.

По данным офисного измерения среднее значение АД у пациентов с РАГ составило 174/100±13/9 мм. рт. ст., ИАГ (индекс апноэ-гипопноэ) 63,8±3,6, ИМТ 37,5±7,2 кг/м². Все пациенты с РАГ получали многокомпонентную антигипертензивную терапию, включающую ИАПФ, антагонисты рецепторов альдостерона, диуретики, бета-адреноблокаторы, антагонисты кальция и препараты центрального действия в максимальных или максимально переносимых дозах. Пациенты с РАГ по исходным характеристикам имели более высокие уровни клинически измеренного систолического и диастолического АД, ИАГ, большую длительность АГ по сравнению с пациентами с контролируемой АГ (12,9±4,8 лет против 5,8±2,5 года, p<0,01) (АД – 141,2/92,4±7,1/4,7 мм. рт. ст.; ИАГ – 28,5±4,2 p<0,01–0,05 у пациентов с контролируемой АД, соответственно).

Стратификация риска пациентов с АГ представлена в таблице 1. Из нее видно, что в группе с РАГ не было пациентов с низким дополнительным риском, чаще встречался высокий дополнительный риск.

Таблица 1.

Стратификация риска у больных АГ.

Дополнительный риск	1 группа (контролируемая АГ), n=23	2 группа (резистентная АГ), n=19
Низкий, n	1 (нет ФР)	0
Средний, n	14 (1–2 ФР)	4 (1–2 ФР)
Высокий, n	8 (3 и более ФР, ПОМ, МС или СД)	15 (3 и более ФР, ПОМ, МС или СД)

В группах больных с артериальной гипертензией, а также у мужчин группы сравнения исследовали уровни комплексов гемоглобина с помощью Raman-спектроскопии.

Приготовление водных растворов гемоглобина

Образцы крови получали натошак из локтевой вены, используя стандартные разовые стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом (цитратом натрия). В качестве антикоагулянта можно использовать цитрат натрия, ЭДТА или гепарин.

Эритроциты прессовали центрифугированием свежей крови при ускорении 2000g. Лейкоциты, тромбоциты и плазму удаляли. Эритроциты промыли и подвергали лизису дистиллированной водой.

Последующее центрифугирование при 25000g и удаление надосадочной жидкости позволило получить стабильный оксигемоглобин. Исходный раствор окси-Нб затем диализовали в фосфатном буфере (рН = 7.5). Деокси-Нб получали добавлением дитионата натрия (Na₂S₂O₄) в небольшом молярном избытке к окси-Нб.

Пропускание азота над раствором гемоглобина позволило предохранить его от окисления. Исходные растворы исследовали спектрофотометрически (Beckman DU800). Концентрации деокси-Нб и окси-Нб соответствовали 3.5 и 3.7 ммоль. Измерения, проведенные до, во время и после CSRS исследований не показали существенных различий в спектрах [15].

Условия и последовательность исследования водных растворов гемоглобина на Raman-спектрометре

Спектры комбинационного рассеяния света (Raman) растворов гемоглобина пациентов записывали с помощью спектрометра с тройным монохроматором T64000 (Horiba Jobin Yvon) при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия Ar⁺ лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение прибора составляло 1,5 см⁻¹. В качестве детектора использовалась кремниевая матрица фотоприемников, охлаждаемая жидким азотом. Применялась приставка для микроскопических исследований комбинационного рассеяния света. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм).

CARS/CSRS Raman-спектроскоп содержит два лазера на красителях (Rh590 и DCM красители), ко-

торые имеют накачку мультимодальным Nd: YAG лазером на второй гармонике (Spectra-Physics DCR-2, 10 Hz, 8 ns). Приблизительно 10% второй гармоники выполнено третим лучом в трехцветных CSRS экспериментах. Все лучи проходят через отдельные оптические каналы, позволяя проводить настройку красного ($\lambda = 610\text{--}650\text{ nm}$) и желтого ($\lambda = 576\text{ nm}$) лучей с помощью двойного ромба Френеля и зеленого луча ($\lambda = 532\text{ nm}$) с помощью полуволновой замедляющей пластинки.

Состояния поляризации может устанавливаться отдельно с помощью высококачественных Глан-Тейлор поляризаторов. Мощность каждого луча (100 пика Дж на пульс) измеряется с помощью PIN фотодиодов для дальнейшей записи сигнала. Линзы ($F = 250\text{ mm}$), укрепленные для исключения механических искажений, фокусируют три луча на образец с пятном 150–200 м в диаметре. Сигнальный луч, проанализированный с помощью Глан-Тейлор призмы, в дальнейшем диспергирован с помощью двойного монохроматора (модифицирован *Jobin Yvon*, 200 мм) и зафиксирован с помощью трубки фотоумножителя (*Hamamatsu 9973BRCA*). Спектры записаны при комнатной температуре со спектральным разрешением $\sim 1.2\text{ cm}^{-1}$ с анализом 50-ти сканов. Спектры скорректированы на флуктуацию интенсивности и эффективность лазера.

Сглаживание экспериментальных данных не применялось. Длины волн второй гармоники I и желтого красителя лазера 1 выбраны как 532,075 и 576 нм, соответственно, так что разность длин волн λ равна 1433 cm^{-1} , что соответствует Raman-региону с сильной вибрацией гемоглобина. В этой конфигурации Raman-диапазон λ с от 1500 до 1680 cm^{-1} может быть перекрыт сканированием λ между 578,3 и 584,5 нм. Образец помещали в проточную кювету (стеклянные стенки толщиной 2 x 150 м) посредством перистальтического насоса. Скорость прокачки выбиралась такой, чтобы раствор полностью обновлялся для каждого нового импульса лазера. Множественная интерференция лучей на границах стекло-воздух предотвращена помещением анти-отражательного покрытия окон. Для удобства работы кювета соответствовала 0,25 мм, будучи оптимальной для данных концентраций образцов.

Для накопления и обработки спектров использовалась прикладная программа (*Horiba Jobin Yvon*), интенсивность пиков Raman-спектров оценивалась в условных единицах.

Были получены дискриминирующие значения уровней комплексов гемоглобина для здоровых обследуемых, пациентов с контролируемой АГ и резистентной АГ. При определении данных уровней у конкретного пациента оценивают «попадание» уровней растворов гемоглобина в пределы значений какой-либо из групп.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Обработка выполнена с использованием программы SPSS, ver. 17. 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, хи-квадрат). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для оценки значимости параметров Raman-спектроскопии с точки зрения дифференциальной диагностики контролируемой и резистентной артериальной гипертензии был использован ROC-анализ с помощью построения приемных характеристических кривых (ROC-кривые).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлен типичный спектр водного раствора гемоглобина, полученный с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (Raman). Он дает возможность оценивать изменения конформации порфирина и содержания комплексов гемоглобина (d-Hb, ox-Hb и Hb-NO) [16]. По данным литературы, соотношение пиков Raman-спектра I1355/I1564 свидетельствует о способности дезоксигемоглобина (d-Hb) связывать O_2 и NO; комплекс с оксидом азота без нарушения связи между белком и гемопорфирином оценивается по соотношению пиков I1626/I1580. Комплекс Hb с оксидом азота при разрушении связи между белком и гемопорфирином регулирует способность Hb отдавать O_2 (I1668/I1580). Пики I, III соответствуют колебательным частотам молекул дезоксигемоглобина; пики II, IV – молекул оксигемоглобина; пики V, VI – колебательным частотам молекул NO, связанных с гемоглобином; соотношение (II/III)/(II/IV) – отражает аффинность гемоглобина к O_2 .

Комплекс гемоглобина с оксидом азота (Hb-NO) при разрушении связи между протеином и гемопорфирином регулирует способность гемоглобина отдавать кислород (рисунок 2), что измеряется соотношением Raman-пиков I1668/I1580. Выявлено достоверное снижение уровня комплексов Hb-NO (II) у пациентов с РАГ по сравнению с таковыми у больных с контролируемой АГ и у здоровых ($p < 0,001\text{--}0,05$), что, вероятно, отражает сниженные запасы эритроцитарного NO и уменьшение выделения O_2 (см. рисунок³) Rodnenkov O. V. и соавт. [16] наблюдали снижение уровня комплексов Hb-NO при ИБС, гипертонии и недостаточности кровообращения, чем исследователи и объяснили нарастающую гипок-

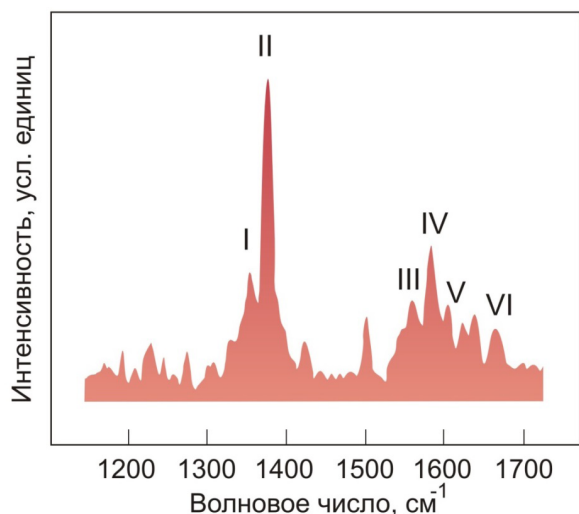


Рисунок 1. Типичный Raman-спектр водного раствора гемоглобина.

сию при данных патологиях; напротив, при горной гипоксии отмечено увеличение содержания комплексов ох-Hb и Hb-NO (II), что усиливает обмен O₂ и, вероятно, имеет компенсаторный характер.

Недостаточность системы продукции NO, приводящей к дисфункции эндотелия, рассматривается как один из почечных механизмов развития РАГ. В эксперименте установлено, что ингибиторы NO-синтазы вызывают системную и гломерулярную гипертензию, ишемию клубочков, тубуло-интерстициальное повреждение и протеинурию. Получены доказательства взаимосвязи уменьшения общей продукции NO и поражения почек при АГ. Дефицит NO развивается вследствие оксидативного стресса за счет инактивации NO супероксидными анионами и воздействия непарной NO-синтазы, в результате чего супероксиды начинают продуцироваться в большей степени, чем NO [17].

Таким образом, внутриэритроцитарные резервы NO при РАГ оказываются сниженными с последующим снижением вазодилатирующих эффектов NO

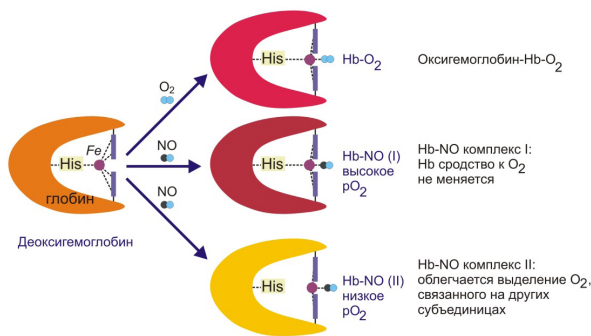


Рисунок 2. Определение содержания в эритроцитах Hb-O₂ и комплексов Hb-NO методом спектроскопии комбинационного рассеяния.

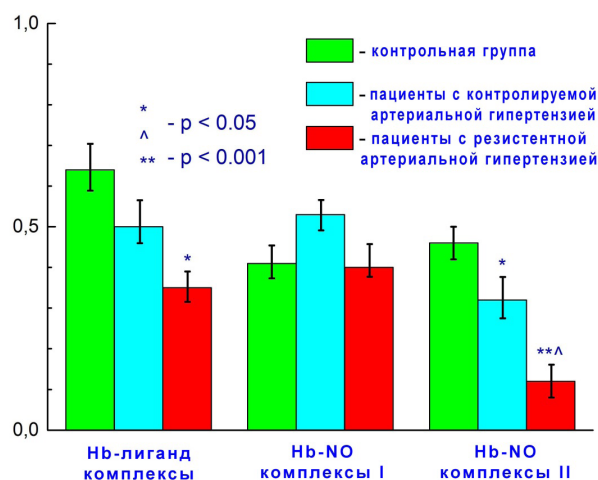


Рисунок 3. Уровни комплексов гемоглобина по данным Raman-спектроскопии у пациентов с резистентной АГ (РАГ), контролируемой АГ и лиц группы сравнения.

на микроциркуляторном уровне. С другой стороны, есть исследования, дающие основание предполагать, что уровни NO или NO-метаболитов в эритроцитах могут непосредственно повлиять на способность этой клетки к освобождению АТФ [6, 7].

Выявленное снижение внутриэритроцитарных резервов оксида азота, снижение его биодоступности, ассоциированное с изменением уровня и состава внутриклеточных макроэргических соединений, вязкоупругих параметров эритроцитов, вероятно, является одним из патогенетических факторов развития резистентной артериальной гипертензии и таргетов для терапевтических воздействий.

Дискриминирующие значения наиболее значимых комплексов гемоглобина у пациентов с артериальной гипертензией представлены в таблице 2.

Для оценки значимости параметров эритроцитов с точки зрения дифференциальной диагностики резистентной и контролируемой артериальной гипертензии был использован ROC-анализ с помощью построения приемных характеристических кривых (ROC-кривые) для различных пиков Raman-спектров водных растворов гемоглобина, результаты которого представлены на рисунке 4.

Получены высокие уровни AUC для различных пиков Raman-спектров (0,680–0,805), свидетельствующие о достаточно высоких уровнях показателей чувствительности и специфичности для отдельно взятых пиков Raman-спектров водных растворов гемоглобина качестве диагностических резистентной и контролируемой артериальной гипертензии.

Результаты оценки совокупности пиков Raman-спектров водных растворов гемоглобина пациентов с артериальной гипертензией для выявления

Таблица 2.

Дискриминирующие значения уровней пиков комбинационного рассеяния света комплексов гемоглобина у пациентов с артериальной гипертензией и в группе сравнения.

Положение пика, см-1	1 группа больные с контролируемой АГ (n=23)	2 группа больные с резистентной АГ (n=19)	3 группа сравнения (n=23)
1325	710-758	540-587	850-900
1350	2100-2240	1740-1800	2750-3000
1550	624-687	520-572	710-780
1580	742-790	610-685	930-960
1660	510-576	430-490	640-685
1668	480-535	340-400	580-624

резистентной и контролируемой форм заболевания по сравнению с данными совокупных клинико-инструментальных методов исследования представлены в таблице 3 [18].

Они демонстрируют достаточно высокие значения чувствительности (73,9%) и специфичности (84,2%), прогностической ценности положительного (85%) и отрицательного результата (72,7%), а также индекса точности (78,6%). Возросшие уровни данных значений при исследовании совокупности пиков Raman-спектров гемоглобина по сравнению с изолированным исследованием отдельных показателей пиков дают возможность предположить необходимость использования «панели интенсивностей пиков Raman-спектров водных растворов гемоглобина» для дифференциальной диагностики контролируемой и резистентной форм артериальной гипертензии. Особенно важны перспективы в определении истинно положительных результатов по резистентной арте-

риальной гипертензии (по данным прогностической ценности «-» результата) в связи с необходимостью комплекса социальных, терапевтических, адаптационных мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение изменения содержания комплексов гемоглобина методом Raman-спектроскопии у пациентов с артериальной гипертензией позволило сделать следующие выводы:

– выявлено достоверное снижение уровня комплексов Hb-NO (II) у пациентов с РАГ по сравнению с таковыми у больных с контролируемой АГ и у здоровых ($p < 0,001-0,05$), что, вероятно, отражает сниженные запасы эритроцитарного NO и уменьшение выделения O_2 ;

– определены дискриминирующие значения уровней пиков комбинационного рассеяния света комплексов гемоглобина у пациентов с артериальной

Таблица 3.

Результаты оценки совокупности пиков Raman-спектров водных растворов гемоглобина пациентов с артериальной гипертензией для выявления резистентной и контролируемой форм заболевания по сравнению с данными совокупных клинико-инструментальных методов исследования.

Результаты исследования Raman-спектров водных растворов гемоглобина	Результаты клинико-инструментальных методов исследования	
	Группа с контролируемой АГ n = 23 случаев	Группа с резистентной АГ n = 19 случаев
Группа с контролируемой АГ n = 20 случаев	Истинно положительный Группа контролируемая АГ n = 17	Ложно положительный Группа резистентная АГ n = 3
Группа с резистентной АГ n = 22 случаев	Ложно отрицательный Группа контролируемая АГ n = 6	Истинно отрицательный Группа резистентная АГ n = 16

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

Чувствительность

$$17: (17 + 6) \times 100\% = 73,9\%$$

Специфичность

$$16: (3 + 16) \times 100\% = 84,2\%$$

Прогностическая ценность

«+» результата метода

$$17: (17 + 3) \times 100\% = 85\%$$

Прогностическая ценность

«-» результата метода

$$16: (6 + 16) \times 100\% = 72,7\%$$

Индекс точности

$$(17 + 16) / (17 + 3 + 6 + 16) \times 100\% = 78,6\%$$

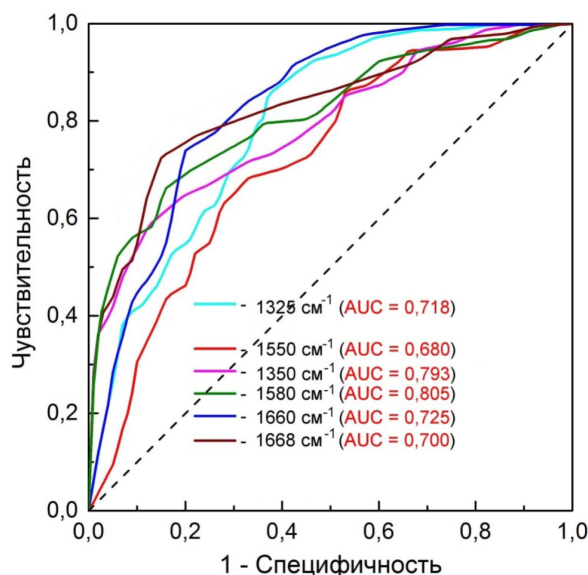


Рисунок 4. ROC-кривые интенсивностей пиков Раман-спектров водных растворов гемоглобина для дифференциальной диагностики резистентной и контролируемой артериальной гипертензии.

гипертензией (в том числе, резистентной) и в группе сравнения;

– установлены наиболее значимые пики Раман-спектров гемоглобина, уровни которых позволяют дифференцировать контролируемую и резистентную артериальную гипертензию – 1325, 1350, 1550, 1580, 1660, 1668 cm^{-1} (AUC – 0,680–0,805);

– определены показатели чувствительности – 73,9%, специфичности – 84,2%, прогностической ценности положительного – 85%, отрицательного результата – 72,7%, а также индекса точности – 78,6% при использовании в качестве диагностического «панели» пиков Раман-спектроскопии гемоглобина теста для выявления резистентной артериальной гипертензии по сравнению с данными совокупных клинико-инструментальных методов исследования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ 7.32–2001. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления. – Минск: Изд-во стандартов, 2001. – 16 с.

2. Бритов А.Н., Быстрова М.М. Резистентная артериальная гипертензия: современные подходы к диагностике и лечению // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – Т. 6. – № 2. – С. 206–211.

3. Дмитриев В.А., Ощепкова Е.В., Титов В.Н., Розга А.Н. и др. С-реактивный белок и интерлейкин-6 при поражении органов-мишеней на ранних стадиях

у больных гипертонической болезнью // Кардиологический вестник. – 2007. – Т. 2. – № 2. – С. 45–49.

4. Ощепкова Е. В., Дмитриев В. А., Титов В.Н. Показатели неспецифичного воспаления у больных гипертонической болезнью // Тер. арх. – 2007. – № 12. – С. 62–67.

5. 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.

6. Alexander J.T., El-Ali A.M., Newman J.L. Karatela S., Predmore B.L., Lefer D.J., Sutliff R.L., Roback J.D. Red blood cells stored for increasing periods produce progressive impairments in nitric oxide – mediated vasodilation // Transfusion. – 2013. – V. 53. – P. 2619–2628.

7. Carroll J., Raththagala M., Subasinghe W., Baguzis S., Oblak T.D. A., Root P., Spence D. An altered oxidant defense system in red blood cells affects their ability to release nitric oxidestimulating ATP // Mol. Bio. Syst. – 2006. – V. 2. – P. 305–311.

8. Sprague R.S., Stephenson A.H., Bowles E.A., Stumpf M.S., Lonigro A.J. Reduced expression of Gi in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release // Diabetes. – 2006. – V. 55. – P. 3588–3593.

9. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Kleinhenz M.E., Lonigro A.J. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity // Am. J. Physiol. – 1998. – V. 275. – P. H1726–H1732.

10. Рабочая группа по лечению артериальной гипертензии Европейского Общества Гипертензии. Рекомендации по лечению артериальной гипертензии. ESH/ESC 2013 // Российский кардиологический журнал. – 2014. – Т. 1. – № 105. – С. 7–94.

11. Halpin S. T. and Spence D. M. Direct plate-reader measurement of nitric oxide released from hypoxic erythrocytes flowing through a microfluidic device // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – P. 7492–7497.

12. Кручинина М. В., Громов А. А., Шварц Я. Ш., Рабко А. В., Баум В. А., Генералов В. М., Кручинин В. Н., Рыхлицкий С. В., Володин В. А. Резистентная артериальная гипертензия: некоторые аспекты патогенеза. // Атеросклероз. – 2015. – Том 11. – № 3. – С. 5–14.

13. Uskokovic-Markovic S., Jelkic-Stankov M., Holclajtner-Antunovic I., Durdevic P. Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool // J. Med. Biochem. – 2013. – V. 32. – P. 96–103.

14. Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for cancer detection: a review // Proceedings – 19th International Conference – IEEE/EMBS Oct. 30 – Nov. 2. – 1997. – Chicago, IL, USA.

15. Etchegoin P., Liem H., Maher R.C., Cohen L.F., Brown R.J. C., Milton M.J. T., Gallop J.C. Observation of dynamic oxygen release in hemoglobin using surface

enhanced Raman scattering // Chemical Physics Letters. – 2003. – V. 367. – P. 223–229.

16. Rodnenkov O.V., Luneva O.G., Ulyanova N.A., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobinhaemoporphyrin conformation: features

revealed in patients with heart failure // Pathophysiology. –2005. -V. 11.-No. 4. – P. 209–213.

17. Чазова И.Е., Данилов Н.М., Литвин А.Ю. Рефрактерная артериальная гипертония: Монография. – М.: Изд-во «Атмосфера», 2014. – 256 с.

18. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. – М.: «ГЭОТАР-Медиа». – 2004. – 240 с.

RAMAN-SPECTROSCOPY OF HEMOGLOBINE IN DIAGNOSTICS OF RESISTANT ARTERIAL HYPERTENSION

Kruchinina M.V., Schwartz Ya.Sh., Gromov A.A., Kruchinin V.N., Volodin V.A., Rykhlytsky S.V.

With the means of Raman-spectroscopy the changes in hemoglobin complexes in hypertensive patients (42 men), including resistant hypertension (19 people) have been studied.

There is a significant decrease in the level of complexes Hb-NO (II) in patients with GRA, compared with those in patients with controlled hypertension and healthy. Discriminatory values determined Raman peak levels of hemoglobin complexes in hypertensive patients (including resistant) and in the comparison group have been observed.

Set the most significant peaks of Raman-spectra of hemoglobin levels allowed the controlled and differentiated resistant hypertension – 1325, 1350, 1550, 1580, 1660, 1668 cm⁻¹ (AUC – 0,680–0,805).

The possibility of application of these parameters for diagnostic purposes was discussed.

Key words: Raman-spectroscopy, hemoglobin, resistant hypertension, diagnostics

*Статья поступила 10 ноября 2016 г.
Принята в печать 15 ноября 2016 г.*