

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## РЕЗИСТЕНТНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ: НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА

М.В. Кручинина<sup>1</sup>, А.А. Громов<sup>1</sup>, Я.Ш. Шварц<sup>1</sup>, А.В. Рабко<sup>1</sup>, В.А. Баум<sup>1</sup>,  
В.М. Генералов<sup>2</sup>, В.Н. Кручинин<sup>3</sup>, С.В. Рыхлицкий<sup>3</sup>, В.А. Володин<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
633159, пос. Кольцово, Новосибирская область

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова» СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

Работа посвящена изучению содержания комплексов гемоглобина, уровня макроэргических соединений, их взаимосвязи с вязкоупругими параметрами эритроцитов у пациентов с резистентной артериальной гипертензией для выявления возможных патогенетических особенностей заболевания. Анализ процессов проводился на основании данных методов спектроскопии комбинационного рассеяния света (Raman), спектроскопии ядерного магнитного резонанса и метода диэлектрофореза эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле – эффективных, чувствительных, неразрушающих методов исследования различных сред, хорошо зарекомендовавших себя при изучении биологических объектов. Исследования эритроцитов проведены в группах пациентов с наличием артериальной гипертензии, в том числе резистентной (42 человека) и группы сравнения (23 человека). Выявленное снижение внутриэритроцитарных резервов оксида азота, снижение его биодоступности, ассоциированное с изменением уровня и состава внутриклеточных макроэргических соединений, вязкоупругих параметров эритроцитов, вероятно, являются одними из патогенетических факторов развития резистентной артериальной гипертензии и таргетов для терапевтических воздействий.

**Ключевые слова:** резистентная артериальная гипертензия (РАГ), гемоглобин, Раман-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, диэлектрофорез эритроцитов.

## ВВЕДЕНИЕ

Резистентная к терапии артериальная гипертензия (РАГ), несмотря на совершенствование методов диагностики артериальной гипертензии (АГ), наличие широкого спектра антигипертензивных препаратов, не стала исчезающим феноменом. Согласно данным экспертов ВОЗ, у

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

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

**Шварц Яков Шмульевич** – д-р мед. наук, зав. лабораторией молекулярно-клеточных механизмов терапевтических заболеваний исследований ХНИЗ, e-mail: yshschwartz@mail.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 отдела биофизики и экологических исследований, e-mail: vmgeneral@mail.ru

**Кручинин Владимир Николаевич** – канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории эллипсомерии, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

**Рыхлицкий Сергей Владимирович** – канд. хим. наук, зав. лабораторией эллипсомерии, 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., Шварц Я.Ш., Рабко А.В., Баум В.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Володин В.А., 2015

больных, лечащихся антигипертензивными препаратами, только у 50 % удается достичь контроля артериального давления (АД). Распространенность резистентной АГ среди пациентов, получающих антигипертензивную терапию, составляет 3–24 % [1]. Литературные данные, посвященные изучению механизмов возникновения рефрактерности, единичны и фрагментарны. В развитии и прогрессировании атеросклеротического поражения сосудов рассматривается роль иммунного повреждения с воспалением сосудистой стенки [2], что признается значимым и в патогенезе РАГ. В связи с тем что терапевтический эффект гипотензивных препаратов чаще всего опосредован влиянием на состояние эндотелия [3], не исключается существование функционального дисбаланса регуляторных цитокинов у больных РАГ.

Одним из возможных патогенетических факторов развития резистентной АГ является нарушение биодоступности эритроцит-производного оксида азота (NO). Вазодилатирующие эффекты NO реализуются на микроциркуляторном уровне, что напрямую связано с функцией эндотелия [4], а капилляры (где выполняют свои функции эритроциты) состоят исключительно из эндотелиальных клеток. 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. Дополнительно описан потенциальный механизм, состоящий в индуцировании аденозинтрифосфата (АТФ) продукции NO в эндотелии через эндотелиальную NO-синтазу (eNOS) [5].

Аспект взаимоотношений эритроцитов и NO у пациентов с РАГ является весьма перспективным с точки зрения возможностей вмешательства в метаболизм NO. Еще одна область, которая требует дальнейшего изучения у пациентов с РАГ, – это клиническая роль эритроцит-производного NO и АТФ. В отношении других патологий показано, что пациенты с диабетом [6, 7], муковисцидозом [8] и первичной легочной гипертензией имели эритроциты, которые высвобождали меньше АТФ по сравнению с эритроцитами цельной крови лиц контрольной группы без этих патологий. Данные литературы свидетельствуют, что эритроциты имеют возможность выделять АТФ в ответ на такой стимул, как индуцированная потоком механическая деформация [8].

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования явилось изучение содержания комплексов гемоглобина, уровня макроэргических соединений, их взаимосвязь с вязкоуп-

ругими параметрами эритроцитов у пациентов с резистентной артериальной гипертензией для выявления возможных патогенетических особенностей заболевания.

Для решения данной задачи в работе планировалось использовать современные физико-химические методы исследования биологических сред: спектроскопию комбинационного рассеяния света (Раман-спектроскопию), спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопию) и измерение диэлектрофореза эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле (ДЭФ в НПЭП).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 42 мужчины ( $53 \pm 7$  лет) с артериальной гипертензией 2-й стадии, у 19 из них выявлена резистентная АГ (РАГ) [9]. Проанализированы отдельно пациенты с контролируемой АГ (23 человека – группа 1), с резистентной АГ (19 человек – группа 2). Группа сравнения состояла из 23 мужчин сопоставимого возраста ( $50 \pm 8$  лет) без АГ и какой-либо другой манифестирующей патологии внутренних органов. Пациентам проведено комплексное клиническое, инструментально-лабораторное обследование, включая эхокардиограмму (ЭКГ), ультразвуковое исследование (УЗИ) сердца, компьютерную томограмму (КТ), электроэнцефалографию (ЭЭГ). По данным офисного измерения среднее значение АД у пациентов с РАГ составило  $174/100 \pm 13/9$  мм рт. ст., индекс апноэ/гипноэ (ИАГ)  $63,8 \pm 3,6$ , индекс массы тела (ИМТ)  $37,5 \pm 7,2$  кг/м<sup>2</sup>. Все пациенты с РАГ получали многокомпонентную антигипертензивную терапию, включающую ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (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 ( $13 \pm 5$  лет против  $6 \pm 3$  года,  $p < 0,01$ ) (АД –  $141,2/92,4 \pm 7,1/4,7$  мм рт. ст.; ИАГ –  $28,5 \pm 4,2$ ,  $p < 0,01–0,05$  у пациентов с контролируемой АД соответственно).

Стратификация риска пациентов с АГ представлена в табл. 1. Из таблицы видно, что в группе с РАГ не было пациентов с низким дополнительным риском, чаще встречался высокий дополнительный риск ( $p = 0,015$ ).

Спектры комбинационного рассеяния света (Raman) растворов гемоглобина пациен-

Таблица 1  
Стратификация риска у больных АГ

Дополнительный риск	Группа 1 (контролируемая АГ), $n = 23$	Группа 2 (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)

Примечание. Суммарные данные для рядов, столбцов –  $DF = 2$ ,  $\chi$ -квадрат = 8,381,  $p = 0,015$ . ФР – фактор риска; ПОМ – поражение органов-мишеней; МС – метаболический синдром; СД – сахарный диабет.

тов записывались с помощью спектрометра с тройным монохроматором Т64000 (Horiba Jobin Yvon) при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия  $Ag^+$  лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение прибора составляло 1,5  $cm^{-1}$ . 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). Водные растворы гемоглобина готовились на основе свежезятой человеческой крови; идентификация пиков, содержание комплексов гемоглобина были аналогичны описанным в работе [10].

Уровень макроэргических соединений эритроцитов оценивался методом ЯМР-спектроскопии взвесей клеток красной крови. Для приготовления взвеси эритроцитов брали кровь из вены, стабилизировали ее 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 1:9. Эритроциты отмывали от плазмы буферным раствором (рН 7,36), содержащим 154 ммоль/л NaCl, 4,3 ммоль/л KCl, при температуре 2–3 °С трехкратным центрифугированием при скорости 1500–2000 об./мин в течение 15 мин.  $^{31}P$  ЯМР-спектры записывались на ЯМР-спектрометре DRX 500 фирмы Bruker (Германия) со следующими характеристиками: частота – 202,46 МГц, количество накопленных спектров – 1024, время задержки между накоплениями – 2 с, развертка – 80 м.д. Для накопления и обработки спектров использовали программу XWIN-NMR, Version 3.1. Идентификация основных пиков спектра представлена в работе [11].

В группах больных с артериальной гипертензией, а также у мужчин группы сравнения исследовали вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза (ДЭФ) в НПЭП

с помощью автоматизированной специализированной установки, использующей электрооптическую систему детекции клеток [12]. В данном исследовании оценивались: амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости и жесткости, индексы агрегации и деструкции эритроцитов.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, Version 10. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения вычислялись среднее значение ( $M$ ) и стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Показатели возраста, длительности АГ представлены как  $M \pm SD$ , где  $SD$  – стандартное отклонение. 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,  $\chi$ -квадрат). Связи между признаками оценивались путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимался равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 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) [13]. По данным литературы, соотношение пиков Raman-спектра I1355/I1564 (где I – интенсивность Raman-пика) 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 1, 3 соответствуют колебательным частотам молекул дезоксигемоглобина; пики 2, 4 – молекул оксигемоглобина, пики 5, 6 – колебательным частотам молекул NO, связанных с гемопорфином, соотношение пиков (2/3)/(3/4) – 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, что измеряется соотношением Raman-пиков I1668/I1580. Выяв-

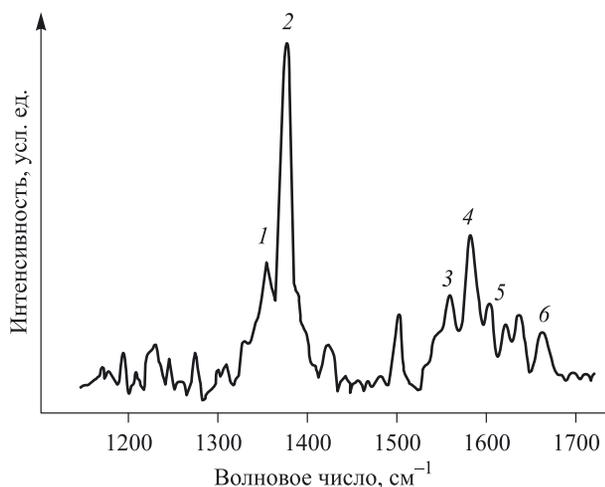


Рис. 1. Типичный Раман-спектр водного раствора гемоглобина. 1–6 – пики

лено достоверное снижение уровня комплексов Hb–NO (пик 2) 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<sub>2</sub> (рис. 2). O.V. Rodnenkov et al. [13] наблюдали снижение уровня комплексов Hb–NO при ишемической болезни сердца (ИБС), гипертонии и недостаточности кровообращения, чем исследователи и

объяснили нарастающую гипоксию при данной патологии; напротив, при горной гипоксии отмечено увеличение содержания комплексов ox-Hb и Hb–NO (пик 2), что усиливает обмен O<sub>2</sub> 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, тубулоинтерстициальное 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 [14].

Таким образом, внутриэритроцитарные резервы NO при РАГ оказываются сниженными с последующим снижением вазодилатирующих эффектов NO 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 [5, 6]. Поэтому следующим этапом нашей работы было иссле-

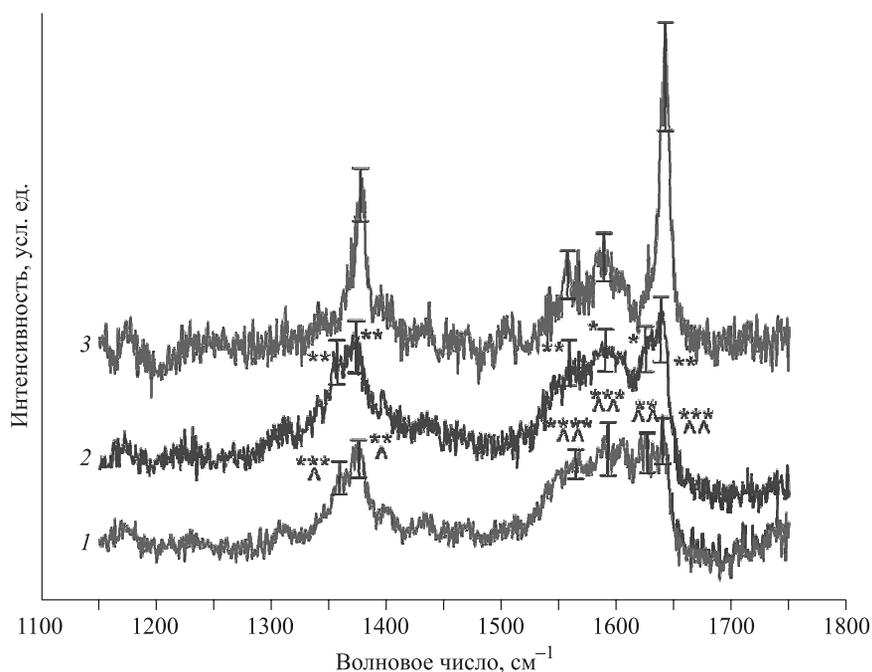
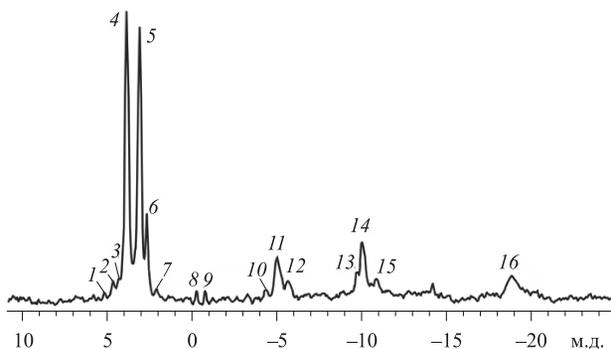


Рис. 2. Раман-спектры водных растворов гемоглобина у пациентов с РАГ (1), контролируемой АГ (2) и лиц группы сравнения (контрольная группа) (3)

\* – достоверность ( $p$ ) отличия от группы сравнения (3): \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ ;  
^ – достоверность ( $p$ ) отличия от группы с контролируемой АГ (2): ^ –  $p < 0,05$ , ^^ –  $p < 0,01$



**Рис. 3.** Типичный  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектр взвесей эритроцитов: 202,46 МГц от 10 до  $-25$  м. д. в  $\text{K}^+\text{-Na}^+$  буфере, pH 7,36 при  $25^\circ\text{C}$  (внутренний стандарт – 2,3 ДФГ, хим. сдвиги: 3,3 м.д. для 3-Р и 2,6 м. д. для 2-Р). 1–16 – пики

дование уровня макроэргических соединений в эритроцитах пациентов исследуемых групп.

Типичный  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектр взвесей эритроцитов представлен на рис. 3. Анализ  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров взвесей эритроцитов у больных с артериальной гипертензией позволил выявить преобладание величин пиков моно- и пирофосфатов, неорганических фосфатов у больных с резистентной АГ и снижение большинства резонансов ди- и трифосфатов, пика гемоглобина, связанного с  $\gamma$ -АТФ (пик 10), по сравнению с таковыми у пациентов с контролируемой АГ (табл. 2). Наиболее выраженными оказались изменения интенсивности пиков 4 и 5, соответствующие резонансу 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), и 11, 14, 16, отражающих резонансы трифосфатов  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -АТФ ( $p < 0,0001\text{--}0,05$ ). 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 трудно деформируемые сферы. Последнее, в свою очередь, затрудняет транспорт кислорода из эритроцита к тканям и усугубляет гипоксию. Снижение содержания в эритроцитах АТФ на 15 % и более изменяет характер взаимодействия спектрина, актина и других интегральных белков эритроцитарной мембраны, образующих единый комплекс и играющих важную роль в поддержании ее структурно-энергетической целостности [15].

Известно, что сродство кислорода к гемоглобину и способность отдавать кислород в тканях регулируются рядом факторов, в том числе уровнем 2,3-ДФГ [15], который снижает сродство гемоглобина к кислороду и сдвигает кри-

вую диссоциации оксигемоглобина вправо. При низком давлении кислорода в тканях в эритроцитах синтезируется большее количество 2,3-ДФГ, что способствует увеличению отдачи кислорода гемоглобином. Изменение содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах влияет на степень фосфорилирования спектрина – основного структурного элемента эритроцитарной мембраны, в целом на деформируемость клетки. Данный органический фосфат выполняет роль триггера в автономной системе модуляции функции эритроцита не только по отношению к сродству гемоглобина к кислороду, но и к микрореологическим свойствам этих клеток крови [16], влияя на высвобождение NO.

Снижение уровня АТФ эритроцитов у пациентов с РАГ может иметь важное следствие, определяющее резистентность гипертензии. В ряде исследований показано, что при воздействии гипоксической среды эритроциты освобождают до  $2\mu\text{M}$  АТФ, и этот АТФ способен активировать eNOS [17–20]. Более того, известно, что при достижении эндотелия АТФ может активировать eNOS через P2Y-рецепторы [21–23]. Этот механизм включает эритроциты как посредника в регуляцию сосудистого тонуса. Он имеет преимущества в связи со стабильностью АТФ в кровотоке в течение более длительных временных промежутков. При этом вазоактивная форма NO образуется ближе к клеткам гладких мышц – в эндотелии, в противоположность таковой из эритроцитов. В этом случае для нестабильной молекулы NO необходимо пройти меньшее расстояние в процессе диффундирования к гладким мышцам (через однослойную клеточную мембрану эндотелиальных клеток), а не через эритроциты и эндотелиальный слой.

При вероятном снижении способности к высвобождению из эритроцитов АТФ при РАГ описанный выше механизм образования NO с последующей вазодилатацией оказывается нарушенным, т.е. уменьшение притока АТФ к эндотелиальным клеткам приводит к падению синтеза оксида азота [21, 24].

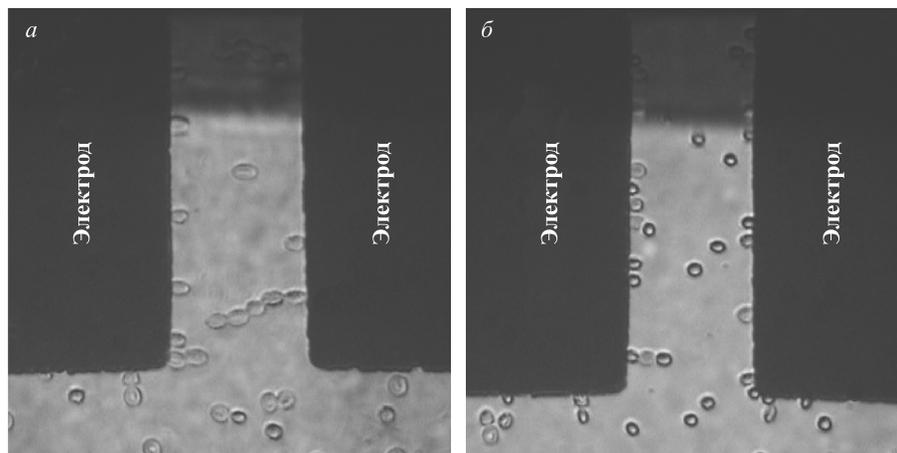
Снижение уровня трифосфатов у пациентов с РАГ ассоциировано и со способностью клеток к деформации, поскольку известно, что снижение пластичности эритроцитов сокращает уровень эритроцит-извлеченного АТФ, происходящего под воздействием деформации [25, 26].

Исследование вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с РАГ позволило выявить достоверно повышенные обобщенные показатели жесткости, вязкости, индексы агрегации, деструкции и пониженные – амплитуды деформации (рис. 4) по сравнению с пациента-

Таблица 2

Характеристики резонансов  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров взвесей эритроцитов у больных с артериальной гипертензией (M+m)

Группа больных	Количество монофосфатных пиков		Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пики 4, 5	
	H, %	W, Гц	W, %	H, Гц	H, %	W, Гц	H, Гц	W, Гц	H(4), %	H(5), %
Группа 1 АГ (n=23)	1,12±0,04	5,410±0,25	57,14±1,20	10,71±2,34	48,12±2,41	6,51±1,14	41,03±1,91	99,98±0,24	98,11±0,60	97,16±1,34
Группа 2 РАГ (n=19)	1,69±0,19	7,921±0,65	64,14±1,52	19,74±2,17	58,14±2,04	10,44±1,03	45,84±2,10	95,15±0,20	93,70±0,75	92,1±2,31
p	<0,02	<0,003	<0,01	<0,01	<0,05	<0,1	<0,05	<0,0001	<0,001	<0,05
Группа больных	Пик 6		Пик 7		Пик 10		Пик 11			
	H, %	W, Гц	Количество пиков пост. неорганического фосфора	H, %	W, %	H, Гц	W, Гц	H(4), %	W, Гц	
Группа 1 АГ (n=23)	91,12±0,86	77,22±1,03	1,20±0,06	24,12±1,32	41,90±1,10	3,98±0,22	51,44±2,0	15,17±0,44	122,51±2,41	
Группа 2 РАГ (n=19)	95,69±0,71	84,41±2,32	1,44±0,05	18,01±1,65	35,15±1,34	2,2±0,32	40,27±2,12	7,89±0,72	102,34±3,0	
p	<0,01	<0,05	<0,02	<0,02	<0,01	<0,02	<0,002	<0,0001	<0,001	
Группа больных	Пик 12		Пик плато пост. γ-АТФ		Пик 13		Пик 16			
	H, %	W, Гц	H, %	W, %	H, Гц	W, Гц	H, Гц	W, Гц		
Группа 1 АГ (n=23)	4,91±0,18	79,90±2,34	3,21±0,25	159,8±3,2	5,78±0,37	45,74±2,92	6,71±0,11	364,56±3,74		
Группа 2 РАГ (n=19)	2,97±0,25	70,53±3,00	2,04±0,34	145,1±2,17	3,21±0,34	38,15±3,04	3,10±0,14	298,37±4,22		
p	<0,0001	<0,05	<0,05	<0,05	<0,002	<0,1	<0,0001	<0,001		
Группа больных	Пик 14		Пик 15		Высота плато α-АТФ, %		Пик 16			
	H, %	W, Гц	H, %	W, %	H, Гц	W, Гц	H, Гц	W, Гц		
Группа 1 АГ (n=23)	18,41±0,62	127,73±2,92	4,974±0,22	72,39±2,2	4,71±0,13	6,71±0,11	6,71±0,11	364,56±3,74		
Группа 2 РАГ (n=19)	10,57±0,82	114,33±3,07	3,721±0,15	60,1±3,1	4,342±0,25	3,10±0,14	3,10±0,14	298,37±4,22		
p	<0,0001	<0,05	<0,001	<0,05	<0,1	<0,0001	<0,001	<0,001		



**Рис. 4.** Разделение и деформация эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля на частоте 1 МГц: *а* – у больных с контролируемой АГ, *б* – у больных с резистентной АГ

ми с контролируемой АГ и группой сравнения ( $p < 0,0001-0,05$ ) (табл. 3). Получены обратные корреляции степени артериальной гипертензии с амплитудой деформации ( $r = -0,71$ ,  $p = 0,02$ ), прямые – с обобщенными показателями жесткости ( $r = 0,62$ ,  $p < 0,001$ ) и вязкости эритроцитов ( $r = 0,57$ ,  $p = 0,002$ ).

Известно, что способность эритроцита к деформации обусловлена ее вязкоупругими свойствами [15, 27]. 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. Также установлено, что между эритроцитами и адсорбированными на их поверхности липопротеида-

ми происходит постоянный обмен холестерина [28]. В результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов увеличиваются их размеры, изменяется их форма с резким снижением их фильтрационной способности [29, 30]. 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, значительно выраженное у пациентов с РАГ, 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 эритроци-

Таблица 3

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

Показатель эритроцитов	Группа 1, больные с контролируемой АГ ( $n = 23$ )	Группа 2, больные с резистентной АГ ( $n = 19$ )	Группа 3, сравнения ( $n = 23$ )
Амплитуда деформации, м	$0,72 \cdot 10^{-6} \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$	$0,59 \cdot 10^{-6} \pm 0,3 \cdot 10^{-6} *$	$2,6 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-6} **\wedge\wedge$
Обобщенный показатель жесткости, Н/м	$7,2 \cdot 10^{-6} \pm 0,6 \cdot 10^{-7}$	$9,5 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-7} *$	$4,2 \cdot 10^{-6} \pm 0,6 \cdot 10^{-6} **\wedge\wedge$
Обобщенный показатель вязкости, Па · с	$0,61 \pm 0,14$	$0,78 \pm 0,09 *$	$0,34 \pm 0,05 **\wedge\wedge$
Индекс агрегации Eг, усл. ед.	$0,68 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,04 *$	$0,45 \pm 0,02 **\wedge\wedge$
Индекс деструкции Eг, %	$5,4 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,3 ***$	$1,01 \pm 0,6 ***\wedge\wedge$

Примечание.  $M$  – среднее,  $m$  – средняя ошибка;

\* – достоверность ( $p$ ) отличия от 1-й группы (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ );

^ – достоверность ( $p$ ) отличия от 2-й группы (^ –  $p < 0,05$ , ^^ –  $p < 0,01$ , ^^ ^ –  $p < 0,0001$ ).

тарные агрегаты повреждают эндотелий сосудов, значительно снижая синтез NO [31]. С другой стороны, в ряде исследований показано, что повышенный уровень свободного гемоглобина вследствие гемолиза эритроцитов может удалять NO, снижая его биодоступность и вызывая сосудистые осложнения [32–34].

При анализе связей электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов с компонентами  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров эритроцитов отмечены обратные корреляции между величинами интенсивности сигналов АТФ и уровнем обобщенной жесткости ( $r = -0,63$ ,  $p = 0,04$  для пика Нб-АТФ;  $r = -0,53$ ,  $p = 0,006$  для пика  $\gamma$ -АТФ;  $r = -0,47$ ,  $p = 0,03$  для пика  $\alpha$ -АТФ), индекса агрегации ( $r = -0,49$ ,  $p = 0,042$  для пика  $\gamma$ -АТФ;  $r = -0,56$ ,  $p = 0,04$  для пика  $\alpha$ -АТФ;  $r = -0,59$ ,  $p < 0,05$  для пика  $\beta$ -АТФ), обобщенной вязкости ( $r = -0,56$ ,  $p < 0,05$  для пика  $\alpha$ -АТФ;  $r = -0,49$ ,  $p = 0,004$  для пика  $\beta$ -АТФ) и прямые – с амплитудой деформации эритроцитов ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,05$  для пика  $\gamma$ -АТФ), что отражает снижение способности клеток к деформации при уменьшении в них запасов макроэргических соединений.

Уровни обобщенных показателей жесткости и вязкости эритроцитов прямо коррелировали с высотой пиков монофосфатов ( $r = +0,55$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,49$ ,  $p = 0,035$ ), интенсивностью резонансов неорганических фосфатов ( $r = +0,66$ ,  $p = 0,026$ ;  $r = 0,54$ ,  $p = 0,039$ ), а также с выраженностью пиков фосфокреатина ( $r = +0,45$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,49$ ,  $p < 0,05$ ) и обратные – с интенсивностью пика 2,3-ДФГ ( $r = -0,52$ ,  $p < 0,01$  для вязкости), что, очевидно, отражает массивный распад макроэргических соединений в клетках с последующим включением компенсаторных механизмов, регулирующих эффективность энергоспроизводящего процесса в эритроцитах при патологических сдвигах.

## ВЫВОДЫ

1. Исследование гемоглобина методом Раман-спектроскопии выявило снижение уровня комплексов Нб-NO (пик 2) у пациентов с резистентной артериальной гипертензией по сравнению с таковыми у больных с контролируемой АГ и у здоровых.

2.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопия взвесей эритроцитов установила преобладание величин пиков моно- и пирофосфатов и снижение большинства резонансов ди- и трифосфатов больных с резистентной артериальной гипертензией в отличие от пациентов с контролируемой АГ и группы сравнения.

3. Метод диэлектрофореза эритроцитов выявил, что при резистентной гипертензии обобщенные показатели жесткости, вязкости, индексы агрегации, деструкции достоверно выше, а амплитуда деформации ниже, чем у пациентов с контролируемой АГ и группой сравнения.

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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Дмитриев В.А., Ощепкова Е.В., Титов В.Н., Рогоза А.Н. и др. С-реактивный белок и интерлейкин-6 при поражении органов-мишеней на ранних стадиях у больных гипертонической болезнью // Кардиол. вестн. 2007. Т. 2, № 2. С. 45–49.
3. Ощепкова Е.В., Дмитриев В.А., Титов В.Н. Показатели неспецифического воспаления у больных гипертонической болезнью // Терапевт. арх. 2007. № 12. С. 62–67.
4. 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.
5. 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. Vol. 53. P. 2619–2628.
6. 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 oxide stimulating ATP // Mol. Biol. Syst. 2006. Vol. 2. P. 305–311.
7. 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. Vol. 55. P. 3588–3593.
8. 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.
9. Рабочая группа по лечению артериальной гипертензии Европейского общества гипертензии. Рекомендации по лечению артериальной гипертензии. ESH/ESC 2013 // Рос. кардиол. журн. 2014. Т. 1, № 105. С. 7–94
10. Etchegoin P., Liem H., Maher R.C., Cohen L.F., Brown R.J.C., Milton M.J.T., Gallop J.C. Observa-

- tion of dynamic oxygen release in hemoglobin using surface enhanced Raman scattering // *Chem. Phys. Lett.* 2003. Vol. 367. P. 223–229.
11. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Громов А.А., Шакиров М.М.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопия эритроцитов и фиброз печени: пилотное исследование // *Бюл. СО РАМН.* 2006. Т. 26, № 4. С. 108–115.
  12. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. 172 с.
  13. Rodnjenkov O.V., Luneva O.G., Ulyanova N.A., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure // *Pathophysiology.* 2005. Vol. 11, N 4. P. 209–213.
  14. Чазова И.Е., Данилов Н.М., Литвин А.Ю. Рефрактерная артериальная гипертензия. М.: Изд-во «Атмосфера», 2014. 256 с.
  15. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
  16. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислород-связующих свойств гемоглобина в генезе кислородной недостаточности при острой экзогенной гипертермии // *Физиол. журн.* 1991. № 3. С. 92–98.
  17. Bergfeld G.R., Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia // *Cardiovasc. Res.* 1992. Vol. 26. P. 40–47.
  18. Dietrich H.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S., Dacey R.G. jr. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000. Vol. 278. P. H1294–H1298.
  19. Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A. H., Dietrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone // *Physiology.* 2009. Vol. 24. P. 107–116.
  20. Faris A., Spence D.M. Measuring the simultaneous effects of hypoxia and deformation on ATP release from erythrocytes // *Analyst.* 2008. Vol. 133. P. 678–682.
  21. Bogle R.G., Coade S.B., Moncada S., Pearson J.D., Mann G.E. Bradykinin and ATP stimulate l-arginine uptake and nitric-oxide release in vascular endothelial-cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 180. P. 926–932.
  22. Burnstock G. Local-Control of blood-pressure by purines // *Blood Vessels.* 1987. Vol. 24. P. 156–160.
  23. Oblak T.D., Root P., Spence D.M. Fluorescence monitoring of ATP-stimulated, endothelium-derived nitric oxide production in channels of a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device // *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78. P. 3193–3197.
  24. Dull R.O., Tarbell J.M., Davies P.F. Mechanisms of flowmediated signal transduction in endothelial cells: kinetics of ATP surface concentrations // *J. Vasc. Res.* 1992. Vol. 29. P. 410–419.
  25. Bateman R.M., Jagger J.E., Sharpe M.D., Ellsworth M.L., Mehta S., Ellis C.G. Erythrocyte deformability is a nitric oxidemediated factor in decreased capillary density during sepsis // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001. Vol. 280. P. H2848–H2856.
  26. Mesquita R., Picarra B., Saldanha C., Silva J.M.E. Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties – An *in vitro* study // *Clin. Hemorheo. Micro.* 2002. Vol. 27. P. 137–147.
  27. 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.
  28. Леонова Т.Я. К вопросу об эритроцитарном механизме регулирования холестеринемии при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1982.
  29. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981. 215 с.
  30. Vanerjee R., Nageshwari K., Puniyani R.R. The diagnostic relevance of red cell rigidity // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1988. Vol. 19, N 1. P. 21–24.
  31. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Изд-во «Триада-Х», 1997. 480 с.
  32. Kim-Shapiro D.B., Lee J., Gladwin M.T. Storage lesion: role of red blood cell breakdown // *Transfusion.* 2011. Vol. 51. P. 844–851.
  33. Reiter C.D., Wang X., Tanus-Santos J.E., Hogg N., Cannon R.O. 3rd, Schechter A.N., Gladwin M.T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 1383–1389.
  34. Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // *JAMA.* 2005. V. 293. P.1653–1662.

**RESISTANT HYPERTENSION: SOME ASPECTS OF PATHOGENESIS**

**M.V. Kruchinina<sup>1</sup>, A.A. Gromov<sup>1</sup>, Ya.Sh Shvarts<sup>1</sup>, A.V. Rabko<sup>1</sup>, V.A. Baum<sup>1</sup>, V.M. Generalov<sup>2</sup>,  
V.N. Kruchinin<sup>3</sup>, S.V. Rykhliitskiy<sup>3</sup>, V.A. Volodin<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *FSBSI «Institute of Internal and Preventive Medicine»  
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

<sup>2</sup> *State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector»  
633159, Kol'tsovo, Novosibirsk*

<sup>3</sup> *A.V. Rzhanov Institute of semiconductor physics SB RAS  
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrent'ev av., 13*

The work was devoted to studying the content of hemoglobin complexes, the level of energy-rich compounds, their relationship with the viscoelastic parameters of red blood cells in patients with resistant hypertension to identify possible pathogenetic features of the disease. Analysis of the processes have carried out on the basis of the methods of Raman spectroscopy (Raman), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) and the method of Dielectrophoresis of erythrocytes (DEF) in a Non-Uniform Alternating Electric Field – effective, sensitive, non-destructive methods of investigation of different environments, proven in studies biological objects. Studies conducted in erythrocytes groups of subjects with arterial hypertension, including – resistant (42 people) and a comparison group (23 persons). The observed reduction in reserves of nitric oxide inside red blood cells, reducing its bioavailability associated with changes in the level and composition of intracellular energy compounds, viscoelastic parameters of red blood cells are probably one of the pathogenetic factors for the development of resistant hypertension and target for therapeutic intervention.

**Keywords:** resistant arterial hypertension, hemoglobin, Raman spectroscopy, NMR spectroscopy, dilectionis of red blood cells.

---

*Статья поступила 1 сентября 2015 г.*