

УДК 616.1, 612.111.6

DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-2-53-63

МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И КАПИЛЛЯРНЫЙ КРОВОТОК ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА: ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

А.И. Масляницyna ✉, И.М. Каданова, А.И. Незнанов, П.Б. Ермолинский,
Ю.И. Гурфинкель, А.А. Пигуренко, Л.И. Дячук, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ленинские горы, 1, Москва, Российская Федерация, 119991

Основные положения

- Проведен анализ параметров агрегации эритроцитов и капиллярного кровотока у пациентов с артериальной гипертензией, в том числе при наличии сахарного диабета 2-го типа. Для измерений использованы оптические методы.
- Показано увеличение агрегации эритроцитов по сравнению с нормой и согласованность результатов, полученных методами *in vitro* и *in vivo*.

Цель	Анализ агрегационных свойств эритроцитов и параметров капиллярного кровотока, измеренных различными оптическими методами, у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и сахарным диабетом второго типа (СД2).
Материалы и методы	Измерения агрегационных свойств проводились <i>in vitro</i> методами лазерной агрегометрии и оптического захвата. Анализ кровотока в капиллярах ногтевого ложа испытуемых выполнен <i>in vivo</i> с использованием цифровой капилляроскопии.
Результаты	Агрегация эритроцитов у пациентов с АГ повышена по сравнению со здоровыми испытуемыми: характерное время агрегации уменьшено на $29 \pm 9\%$. Эта же тенденция к усилению агрегации видна в группе пациентов с АГ и СД2. Сопоставление результатов, полученных с использованием различных методов измерения, показало, что в группе пациентов с АГ с повышенной скоростью кровотока, измеренной <i>in vivo</i> , индекс агрегации, измеренный <i>in vitro</i> , снижен на $14 \pm 4\%$ по сравнению с группой с пониженной скоростью.
Заключение	Сравнение значений микрореологических параметров крови, характерных для групп пациентов с АГ, в том числе при наличии СД2, и здоровых доноров, показывает статистически значимые отличия: у пациентов с АГ агрегация эритроцитов повышена. Эти отличия выражены сильнее у пациентов с АГ и СД2. Кроме того, результаты, полученные различными оптическими методами <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> , согласуются между собой.
Ключевые слова	Реология крови • Агрегация эритроцитов • Лазерный пинцет • Лазерная агрегометрия • Цифровая капилляроскопия • Артериальная гипертензия • Сахарный диабет

Поступила в редакцию: 13.04.2020; поступила после доработки: 29.04.2020; принята к печати: 13.05.2020

MICRORHEOLOGIC PROPERTIES OF BLOOD AND CAPILLARY BLOOD FLOW IN CASE OF ARTERIAL HYPERTENSION AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS: *IN VITRO* AND *IN VIVO* OPTICAL ASSESSMENT

A.I. Maslianitsyna ✉, I.M. Kadanova, A.I. Neznanov, P.B. Ermolinskiy,
Yu.I. Gurfinkel, A.A. Pigurenko, L.I. Dyachuk, A.E. Lugovtsov, A.V. Priezzhev

Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119991

Highlights

- Parameters of red blood cell (RBCs) aggregation and capillary blood flow in patients suffering from arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus (DM2) have been examined using optical methods.

Для корреспонденции: Анастасия Игоревна Масляницyna, stasyazavr2000@biomedphotonics.ru; адрес: Ленинские горы, 1, Москва, Россия, 119991

Corresponding author: Anastasia I. Maslianitsyna, maslianitsyna.ai16@physics.msu.ru; address: 1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119991

An increase in RBCs aggregation compared to the reference value have been determined.

- The consistency of *in vivo* and *in vitro* results has been demonstrated.

Aim	To study microrheological properties of RBCs and capillary blood flow parameters using optical methods in patients with arterial hypertension (AH) and type 2 diabetes mellitus (DM2).
Methods	RBCs aggregation properties were evaluated <i>in vitro</i> using laser aggregometry and optical trapping. Capillary nail refill was evaluated <i>in vivo</i> using nailfold digital capillaroscopy.
Results	The aggregation of RBCs in patients suffering from AH was higher compared to healthy subjects who demonstrated a decrease in the aggregation time by 29±9%. A similar trend was observed in patients with AH and DM2. The comparison of the results obtained by different methods showed that patients with AH with a high capillary blood flow velocity measured <i>in vivo</i> reported a decrease in the aggregation index by 14±4% compared to patients with low velocity.
Conclusion	The comparison of microrheological blood properties in patients with AH and AH+DM2 versus the control group showed statistically significant differences in the aggregation index that was higher in AH patients. These differences were more pronounced in patients with AH and DM2. The results obtained by <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> methods were consistent.
Keywords	Blood rheology • Red blood cells aggregation • Laser tweezers • Laser aggregometry • Digital capillaroscopy • Arterial hypertension • Diabetes mellitus

Received: 13.04.2020; received in revised form: 29.04.2020; accepted: 13.05.2020

Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия	СКК – скорость капиллярного кровотока
ЛА – лазерная агрегометрия	АИ – индекс агрегации
ЛП – лазерный пинцет	T _{agg} – время агрегации
СА – сила агрегации	T _{1/2} – среднее время агрегации
СД2 – сахарный диабет 2-го типа	

Введение

Важная роль в прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний и развитии осложнений принадлежит нарушениям реологических свойств крови. В среднем в организме взрослого человека содержится более 10^{11} кровеносных сосудов. Свыше 99% из них относятся к системе микроциркуляции [1]. Различные механизмы направлены на адаптацию системы микроциркуляции к воздействию внешних факторов. Одним из них является изменение микрореологических свойств крови, главным образом, способности эритроцитов к обратимой спонтанной агрегации и деформации под действием сдвиговых напряжений в потоке крови. Своевременное выявление нарушений микроциркуляторных и микрореологических параметров дает возможность диагностики ранних проявлений артериальной гипертензии (АГ) [2] и, соответственно, адекватного контроля эффективности применения антиагрегантов, что представляется особенно актуальным у пациентов с аортокоронарным шунтированием и стентированием, получившими широкое распространение за последние десятилетия.

Механизмы регуляции реологических свойств крови и микроциркуляции подвергаются серьезным нарушениям при ряде заболеваний, среди которых на первом месте сахарный диабет 2-го типа (СД2) [3]. Пациенты с СД2 имеют более высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний из-за неспособности микрососудистого русла обеспечить ткани и органы в соответствии с их метаболической потребностью. Сахарный диабет и связанное с ним ухудшение транспорта газов и питательных веществ через сосудистую стенку приводят не только к морфологическим изменениям, прежде всего извитости микрососудов, но и нарушениям реологических свойств крови [4].

Целью работы является сравнение изменений агрегационных параметров эритроцитов и капиллярного кровотока, измеренных различными оптическими методами, у пациентов с АГ и СД2. Кроме того, ставится задача сопоставления результатов, полученных с использованием методов измерений *in vitro* и *in vivo*, и анализа их взаимного дополнения.

Материалы и методы

Пациенты

Дизайн эксперимента, проводившегося с августа 2017 г. по ноябрь 2019 г., предусматривал включение 68 пациентов с АГ (от 24 до 83 лет; средний возраст 58,4 года), поступивших в кардиологическое отделение МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова. Первая стадия АГ выявлена у 7 (11,86%) пациентов, вторая стадия – у 18 (30,51%), третья стадия – у 34 (57,63%). Стадию АГ устанавливали согласно критериям Всероссийского научного общества кардиологов 2010 г. Также учитывались рекомендации Европейского общества кардиологов (2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension).

Критерии исключения из исследования: ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность, нарушения ритма сердца и проводимости, почечная и печеночная недостаточности, сахарный диабет первого типа; сосудистая или какая-либо другая патология головного мозга, онкологические заболевания в анамнезе.

Пациенты разделены на две группы: в первую вошли пациенты с АГ (n = 59), во вторую – с АГ и СД2 (n = 9). Группу контроля составили 15 здоровых некурящих и не принимающих каких-либо медицинских препаратов добровольцев (средний возраст 22,5 года). Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1. Измерение артериального давления и частоты сердечных сокращений проводилось в утренние часы, в интервале 8:00–8:30, до приема медикаментозных препаратов на следующий день после госпитализации в кардиологическое отделение.

Всем пациентам проведены лабораторные и ин-

струментальные исследования, соответствующие российским и международным стандартам, включая трансэхокардиальную эхокардиографию, суточное мониторирование артериального давления, тредмил-тест, ультразвуковое исследование почек и надпочечников, а также брахиоцефальных артерий.

Дополнительно к общепринятым рутинным исследованиям пациентам выполнены неинвазивное исследование параметров микроциркуляции в тканях ногтевого ложа методом цифровой капилляроскопии, а также забор венозной крови для измерения ее агрегационных свойств методами лазерной агрегометрии (ЛА) и лазерного пинцета (ЛП). Также проведено исследование агрегационных свойств крови методами ЛА и ЛП в контрольной группе.

Дизайн исследования одобрен локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова. Пациенты и здоровые добровольцы были поставлены в известность о цели исследования, подписав информированное согласие на участие в нем.

Метод лазерной агрегометрии

Для измерения агрегационных параметров эритроцитов в цельной крови использовался метод ЛА, основанный на диффузном рассеянии лазерного излучения кровью и реализованный в лазерном агрегометре эритроцитов RheoScan (RheoMedTech, Республика Корея) [5]. Для этого в кювету с плоским резервуаром помещен образец цельной крови объемом 8 мкл. Образец освещен лазерным пучком малой мощности (длина волны 633 нм). Падающее излучение рассеивается на эритроцитах и их агрегатах преимущественно вперед.

Таблица 1. Клинические данные пациентов
Table 1. Comparison of the clinical characteristics of patients

Параметр / Parameter	Пациенты с АГ / Patients with AH (n = 59)	Пациенты с АГ и СД2 / Patients with AH and DM2 (n = 9)	p-критерий значимости различий по Стьюдент-тесту или по тесту Фишера* / A p-value for the Student or Fisher's* test
Число (%) мужчин / Number (percentage) of males	26 (44,1)	6 (66,7)	0,131*
Средний возраст (диапазон), лет / Mean age (range), years	57,2 (24–83)	66,2 (49–71)	0,006
Индекс массы тела, кг/м ² / Body mass index, kg/m ²	30±5	36±5	0,017
Число (%) курящих / Number (percentage) of smokers	12 (20,3)	4 (44,4)	0,096*
Систолическое давление, мм рт. ст. / Systolic blood pressure, mm Hg	144±2	149±16	0,373
Диастолическое давление, мм рт. ст. / Diastolic blood pressure, mm Hg	86±12	90±14	0,519
Частота сердечных сокращений, уд/мин / Heart rate, bpm	71±13	76±11	0,317
Фракция выброса / Ejection fraction, %	61±6	56±6	0,066
Число (%) пациентов, принимавших антиагреганты / Number (percentage) of patients taking antiplatelets	17 (28,8)	5 (55,6)	0,087*
Число (%) пациентов, принимавших диуретики / Number (percentage) of patients taking diuretics	32 (54,2)	7 (77,8)	0,127*

Примечание: * – p-критерий, рассчитанный с использованием точного теста Фишера; АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет второго типа.

Note: * – p-value calculated using Fisher's exact test; AH – arterial hypertension; DM2 – type 2 diabetes mellitus.

Чем больше размер рассеивающей частицы, тем больше света рассеивается вперед [6]. Поэтому в начале, в состоянии максимальной агрегации эритроцитов из-за отсутствия сдвиговых напряжений, образец рассеивает падающее на него излучение так, что интенсивность этого излучения, измеренная в направлении падающего пучка, максимальна (рис. 1).

Далее встроенный в кювету тонкий металлический стержень под действием внешнего магнитного поля приводится во вращательное движение, создавая при этом сдвиговые напряжения в потоке крови внутри кюветы и разрушая тем самым образовавшиеся агрегаты до состояния полной дезагрегации. Заметим, что сами эритроциты остаются при этом интактными и их мембрана не претерпевает необратимых изменений. После остановки перемешивания

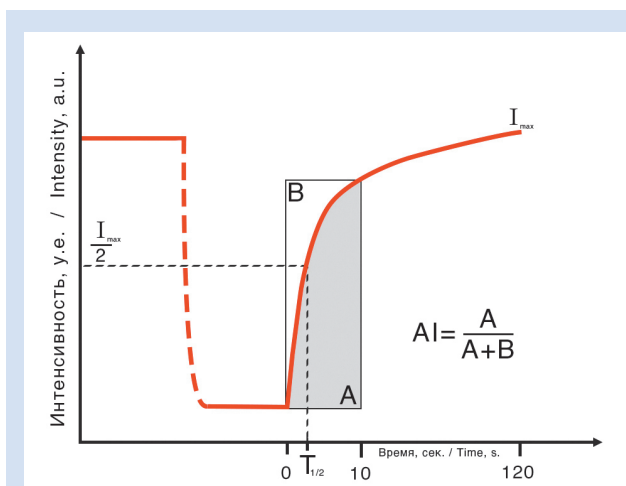


Рисунок 1. Кинетика спонтанной агрегации эритроцитов

Примечание: I_0 – интенсивность света, рассеянного вперед от слоя цельной крови, при максимальной агрегации эритроцитов; $T_{1/2}$ – условный параметр, определяющий в агрегометре RheoScan характерное время образования агрегатов в исследуемом образце крови.

Figure 1. Kinetics of spontaneous aggregation of red blood cells
Note: I_0 is the intensity of light scattered forward from the whole blood layer at maximum aggregation of RBCs; $T_{1/2}$ is an arbitrary parameter calculated by RheoScan aggregometer to determine the time of aggregate formation in the blood sample.

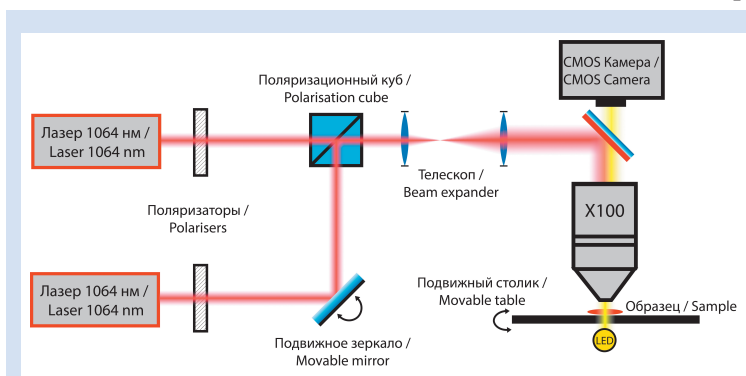


Рисунок 2. Схема двухканального лазерного пинцета [7]

Figure 2. Scheme of double-channel laser tweezers [7]

[Ermolinskiy, P., Lugovtsov, A., Maslyanitsina, A., Semenov, A., Dyachuk, L., & Priezzhev, A. (2018). Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 4(3), 030303. doi:http://dx.doi.org/10.18287/JBPE18.04.030303. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)].

(момент времени $t = 0$ на рис. 1) начинается процесс спонтанной агрегации эритроцитов, в течение которого измеряется зависимость интенсивности рассеянного вперед лазерного излучения от времени – агрегационная кинетика. Со временем интенсивность прошедшего вперед света увеличивается, так как за счет образования агрегатов увеличивается средний размер рассеивающих центров. Процесс спонтанной агрегации эритроцитов занимает примерно 2 минуты, после чего интенсивность рассеянного света достигает максимального значения. Это указывает на то, что в образце практически все эритроциты проагрегировали.

По агрегационной кинетике определяется характерное время образования агрегатов $T_{1/2}$ как время, за которое интенсивность света, рассеянного вперед, достигает половинного значения интенсивности, измеренной при максимальной агрегации клеток в образце. Уменьшение времени $T_{1/2}$ означает ускоренную агрегацию. Также определяется индекс агрегации (AI), характеризующий количество клеток, проагрегировавших за 10 секунд в процентах. Данная величина вычисляется как отношение площади под кривой, описывающей агрегационную кинетику, к суммарной площади над и под кривой за первые 10 секунд процесса спонтанной агрегации.

Лазерный пинцет или метод оптического захвата

Для измерения силы взаимодействия двух одиночных эритроцитов, а также времени, в течение которого происходит спонтанная агрегация двух клеток, использовался двухканальный ЛП [7]. Схема экспериментальной установки приведена на рис. 2.

В качестве источников излучения применены два Nd:YAG-лазера с длиной волны 1064 нм и мощностью 200 мВт каждый. На выходе пучка из системы линз установлено дихроичное зеркало, с помощью которого пучок подается на заднюю входную апертуру объектива Olympus (x100, NA = 1,00; водная иммерсия), а также частично пропускается на фотодетектор для измерения мощности. Один пучок всегда неподвижен,

на пути второго пучка установлено зеркало, вращение которого позволяет перемещать область фокусировки пучка. Таким образом, используются 2 области захвата (2 ловушки): одна неподвижная, другая – перемещаемая в кювете с образцом.

Измерения проводились в стеклянной микрокювете толщиной 100 мкм, в которую помещалась сильно разбавленная суспензия эритроцитов в аутологичной плазме, обедненной тромбоцитами.

Перед измерениями силы оптического захвата выполнена калибровка установки, необходимая для определения однозначной связи между значениями этой силы в пиконьютонах и мощности лазерного пучка ловушки в милливаттах. Процедура калибровки ЛП более подробно описана ранее [8].

Измерение силы агрегации (СА) и времени агрегации состоит из трех последовательных операций. Сначала два эритроцита захватывают с помощью ЛП и ориентируют параллельно друг другу. Один из эритроцитов захватывают неподвижной ловушкой, второй — подвижной. Затем клетки с помощью подвижной ловушки приводят в контакт таким образом, чтобы площадь начального взаимодействия составила порядка 40% площади поверхности каждой клетки. После этого мощность подвижного лазерного пучка уменьшается до тех пор, пока удерживающей силы со стороны ловушки станет недостаточно для препятствия спонтанной агрегации эритроцитов. В этот момент фиксируют значение мощности пучка, вычисляют значение силы оптического захвата, которое приравнивается к силе агрегации.

Для измерения времени спонтанной агрегации (T_{agg}) пары эритроцитов клетки сводят до точечного контакта мембранами и оба лазерных пучка лазера одновременно выключают. Уменьшение этого времени означает ускоренную агрегацию.

Метод цифровой капилляроскопии

Метод цифровой капилляроскопии использовался для оценки параметров кровотока *in vivo*. С помощью прибора «Капилляроскан-1» («Новые энергетические технологии», Россия) проведена количественная оценка характеристик потока крови в капиллярах ногтевого ложа, а также оценка присутствия агрегатов в кровотоке. Более подробно этот метод описан ранее [9]. Средняя скорость капиллярного кровотока (СКК), измеренная с помощью покадровой обработки серии видеоизображений нескольких капилляров у каждого пациента, означает среднюю скорость эритроцитов в капилляре. Также проводилась визуальная оценка наличия или отсутствия агрегатов в капилляре. Важными критериями определения является то, что агрегаты отделены друг от друга плазмой и обычно замедляют поток, в котором они находятся.

Подготовка образцов крови к измерениям

Все измерения *in vitro* выполнены на образцах цельной человеческой крови в случае агрегометрии и на суспензии эритроцитов при использовании лазерного пинцета. При проведении исследований учитывались последние рекомендации для гемореологических лабораторий, разработанные

международной экспертной группой для стандартизации гемореологических методов [10]. Измерения проводились при температуре 37 °С в течение первых 3 часов после забора крови из локтевой вены пациентов или здоровых доноров натощак. При этом все образцы стабилизированы антикоагулянтом ЭДТА К2 (2-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Статистический анализ

Для каждой взятой пробы крови микрореологические параметры, полученные на RheoScan (AI , $T_{1/2}$), усреднялись по 5 различным измерениям. Измерения силы и времени агрегации (CA , T_{agg}) на ЛП для каждого образца проводились не менее чем на 15 парах различных эритроцитов и затем усреднялись. На рис. 3–7 представлены средние значения и стандартные отклонения величин от среднего значения. Статистическая значимость различий между двумя выборками оценивалась по двустороннему Стьюдент-тесту с неравными дисперсиями. Отличия выборок считали статистически значимыми, если p -критерий значимости различий по Стьюдент-тесту был менее 0,05.

Результаты

Результаты статистической обработки показателей агрегации эритроцитов (AI , $T_{1/2}$, T_{agg} и CA), измеренных *in vitro*, у пациентов с АГ, АГ + СД2 и здоровых доноров представлены на рис. 3.

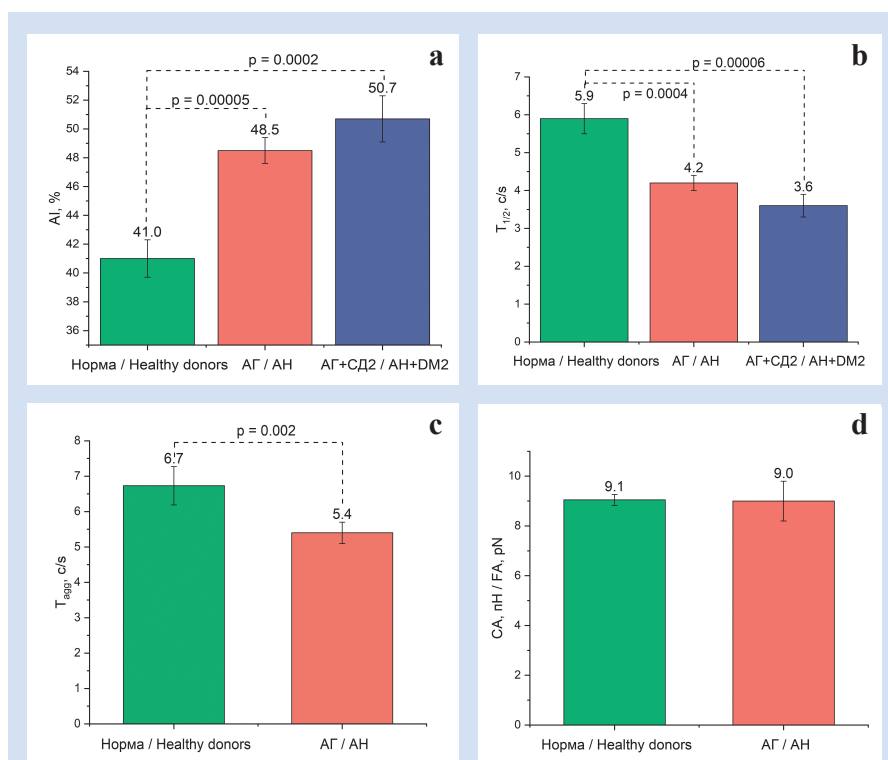


Рисунок 3. Значения индекса агрегации (AI) – а, среднего времени агрегации ($T_{1/2}$) – б, времени парной агрегации (T_{agg}) – с, силы агрегации (CA) – д – для контрольной группы и групп пациентов с АГ и АГ + СД2

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет второго типа.

Figure 3. Aggregation index AI (a), average aggregation time $T_{1/2}$ (b), time of cell-cell aggregation T_{agg} (c) and force aggregation FA (d) in the control group and the group of patients with AH (a–d) and hypertensive patients with DM2 (a–b).

Note: AH – arterial hypertension; AI – aggregation index; DM2 – type 2 diabetes mellitus; FA – force aggregation.

Значения всех измеренных параметров кроме СА групп пациентов с АГ и АГ + СД2 статистически значимо отличались от контрольной группы. В первой группе агрегация повышена: в среднем АІ увеличен на $18 \pm 7\%$ относительно нормы ($p = 0,00005$), $T_{1/2}$ уменьшено на $29 \pm 9\%$ ($p = 0,0004$), T_{agg} уменьшено на $18 \pm 12\%$ ($p = 0,002$). У пациентов с АГ и СД2 различия более выражены: АІ увеличен на $24 \pm 6\%$ относительно нормы ($p = 0,0002$), $T_{1/2}$ уменьшено на $39 \pm 7\%$ ($p = 0,00006$).

Для того чтобы сопоставить результаты, полученные методами измерения *in vitro* и *in vivo*, данные пациентов с АГ и АГ + СД2 разбиты на подгруппы по параметрам капилляроскопии – наличию и отсутствию агрегатов в капиллярах – и по значению СКК – менее и более 800 мкм/с. Данные с количеством пациентов (образцов крови) в каждой группе представлены в табл. 2, а соответствующие диаграммы – на рис. 4–7.

На рис. 4 показаны значения АІ, измеренного с

помощью ЛА. В первой группе пациентов отсутствие агрегатов в капилляре соответствовало пониженному значению АІ и, наоборот, присутствие агрегатов – повышенному. Однако статистически значимых различий АІ в подгруппах не обнаружено. У пациентов второй группы наблюдалась обратная тенденция к понижению АІ с появлением агрегатов в капиллярах, однако статистически значимых различий не выявлено. Более высокая статистическая значимость характерна для разбиения по СКК: у пациентов первой группы с высокой СКК АІ достоверно ниже на $14 \pm 4\%$ ($p = 0,00002$) в сравнении с пациентами с низкой СКК, во второй группе отмечено статистически значимое снижение АІ на $12 \pm 4\%$ ($p = 0,039$).

На рис. 5 показаны значения $T_{1/2}$, измеренного с помощью ЛА. Отсутствие агрегатов в капиллярах у пациентов первой группы статистически значимо ($p = 0,03$) соответствовало повышению $T_{1/2}$ на $19 \pm 6\%$; у второй группы пациентов различия выявлены,

но они статистически незначимы. Для двух групп пациентов с разными значениями СКК значения $T_{1/2}$ статистически значимо отличались: при низкой СКК параметр уменьшен на $31 \pm 6\%$ в первой группе ($p = 0,0001$) и на $29 \pm 5\%$ – во второй ($p = 0,04$).

На рис. 6 показаны значения T_{agg} , измеренного с помощью ЛП у первой группы пациентов. У пациентов с наличием агрегатов в капиллярах парные агрегаты образовывались статистически значимо быстрее на $23 \pm 11\%$ ($p = 0,035$). Для СКК видна только тенденция: у пациентов с повышенной СКК значение T_{agg} ниже, однако это различие статистически незначимо ($p = 0,4$).

Таблица 2. Количество образцов в каждой подгруппе
Table 2. Number of samples in each subgroup

Параметры капилляроскопии / Capillaroscopy parameters	Число (%) пациентов с АГ / Number (percentage) of patients with АН (n = 59)	Число (%) пациентов с АГ + СД 2 / Number (percentage) of patients with АН + DM2 (n = 9)
Агрегаты / Aggregates		
есть (1) / presence	18 (30,5)	4 (44,4)
нет (0) / absence	41 (69,5)	5 (55,6)
СКК, мкм/с / CBV, $\mu\text{m/s}$		
более / higher than 800	26 (44,1)	5 (55,6)
менее / lower than 800	33 (55,9)	4 (44,4)

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет второго типа; СКК – скорость капиллярного кровотока.
Note: АН – arterial hypertension; CBV – capillary blood flow velocity; DM2 – type 2 diabetes mellitus.

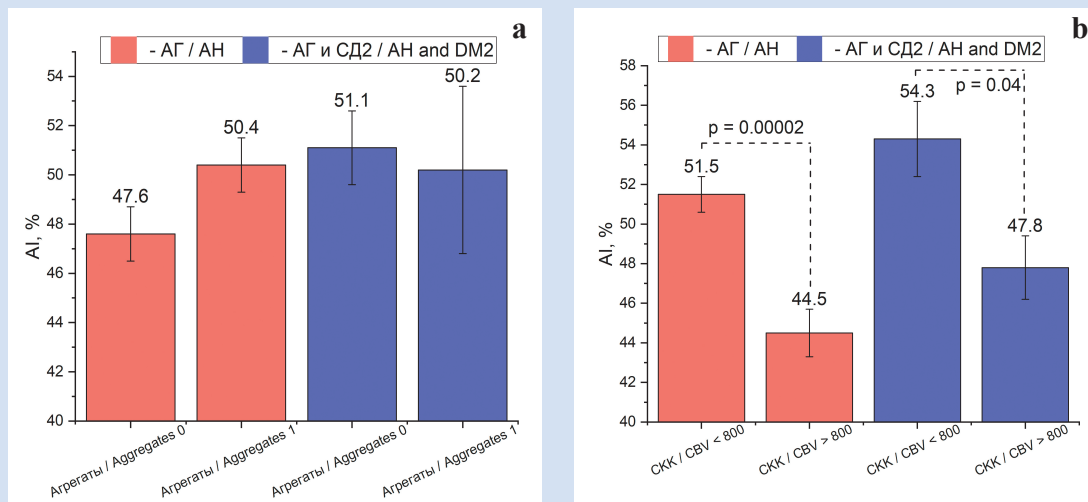


Рисунок 4. Значения индекса агрегации (АІ) у пациентов с АГ и АГ + СД2 при отсутствии (0) и наличии (1) агрегатов в капиллярах (а) и скорости капиллярного кровотока менее и более 800 мкм/с (б)

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет второго типа; СКК – скорость капиллярного кровотока.
Figure 4. Aggregation index AI in patients with АН and hypertensive patients with DM2 when the aggregates are present or absent in capillaries (a) and when CBV is lower or higher than 800 $\mu\text{m/s}$ (b)

Note: АН – arterial hypertension; АІ – aggregation index; CBV – capillary blood flow velocity; DM2 – type 2 diabetes mellitus.

На рис. 7 показаны значения СА эритроцитов, измеренной с помощью ЛП. В этом случае наличие или отсутствие агрегатов в капиллярах и различные СКК не показали статистически значимых отличий между группами.

Обсуждение

Исследование агрегационных свойств эритроцитов *in vitro* и параметров капиллярного кровотока *in vivo* у пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом второго типа показало статистически значимые различия в агрегации эритроцитов между этими пациентами и здоровыми людьми контрольной группы. В частности, индекс агрегации эритроцитов, измеренный *in vitro*, у пациентов

только с артериальной гипертензией увеличивался на $18 \pm 7\%$. У пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом второго типа наблюдалась тенденция к повышению индекса агрегации по сравнению с группой пациентов без диабета. Также отмечены согласованные изменения некоторых параметров агрегации эритроцитов, измеренных *in vitro* и *in vivo*. Так, индекс агрегации, измеренный *in vitro*, статистически значимо увеличивался при снижении скорости капиллярного кровотока, измеренной *in vivo*. Также в группе пациентов с артериальной гипертензией выявлено снижение значений времени агрегации эритроцитов, измеренных *in vitro* как методом лазерной агрегометрии (на $16 \pm 6\%$), так и лазерного пинцета (на $19 \pm 11\%$), с появлением агрегатов

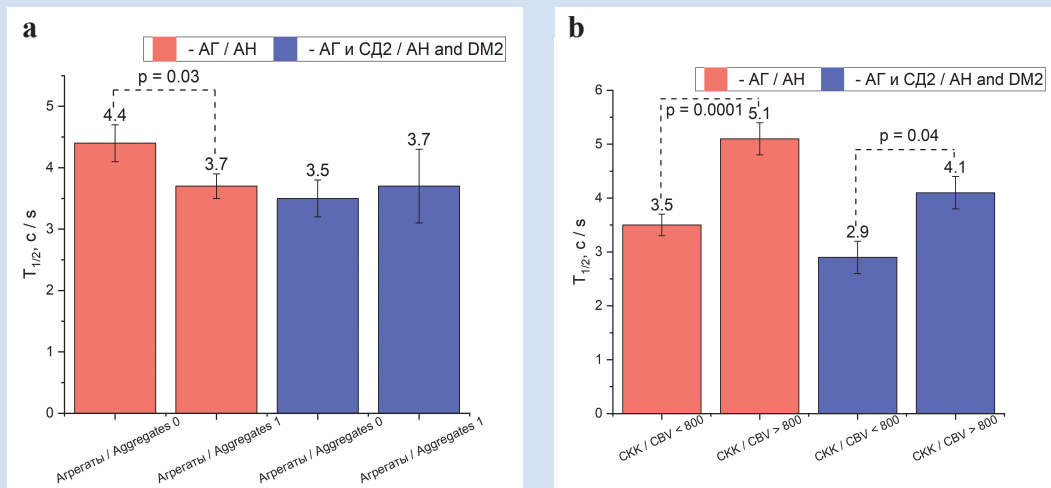


Рисунок 5. Значения среднего времени агрегации ($T_{1/2}$) у пациентов с АГ и АГ + СД2 при отсутствии (0) и наличии (1) агрегатов в капиллярах (а) и значений скорости капиллярного кровотока менее и более 800 мкм/с (б)

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; СД2 – сахарный диабет второго типа; СКК – скорость капиллярного кровотока.

Figure 5. Average aggregation time $T_{1/2}$ in patients with AH and hypertensive patients with DM2 when the aggregates are present or absent in capillaries (a) and when CBV is lower or higher than 800 $\mu\text{m/s}$ (b)

Note: AH – arterial hypertension; CBV – capillary blood flow velocity; DM2 – type 2 diabetes mellitus.

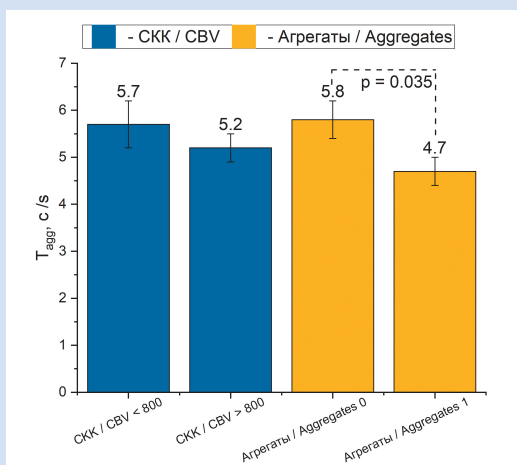


Рисунок 6. Значения времени парной агрегации (T_{agg}) у пациентов только с АГ при отсутствии (0) и наличии (1) агрегатов в капиллярах и скорости капиллярного кровотока менее и более 800 мкм/с

Примечание: СКК – скорость капиллярного кровотока.

Figure 6. Time of cell-cell aggregation T_{agg} in patients with AH when the aggregates are absent (0) or present (1) in capillaries and when CBV is lower or higher than 800 $\mu\text{m/s}$

Note: CBV – capillary blood flow velocity.

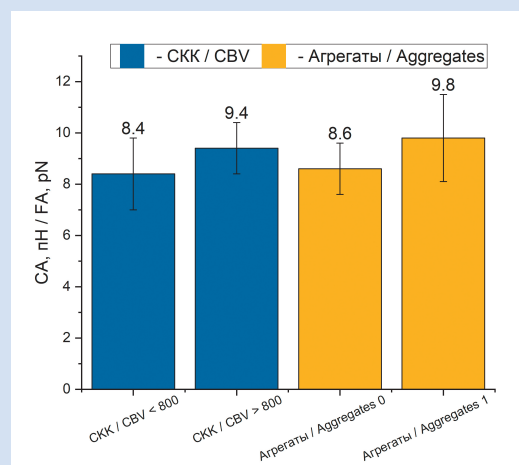


Рисунок 7. Значения силы парной агрегации (СА) эритроцитов у пациентов только с АГ при отсутствии (0) и наличии (1) агрегатов в капиллярах и скорости капиллярного кровотока менее и более 800 мкм/с

Примечание: СКК – скорость капиллярного кровотока.

Figure 7. Aggregation force in patients with only AH when the aggregates are absent (0) or present (1) in capillaries and when CBV is lower or higher than 800 $\mu\text{m/s}$

Note: CBV – capillary blood flow velocity.

в капилляре по данным цифровой капилляроскопии. В силе агрегации, измеренной с помощью лазерного пинцета, статистически значимых различий не обнаружено.

Предыдущие исследования [7, 11] агрегации эритроцитов у пациентов с артериальной гипертензией проведены с использованием только методов *in vitro* на меньшем количестве исследуемых и с меньшим числом подгрупп. Новизна представленной работы заключается в комплексном анализе *in vitro* и *in vivo* результатов измерений на пациентах двух групп: с артериальной гипертензией и артериальной гипертензией и диабетом второго типа. Результаты исследований, выполненных альтернативными методами, в которых также показано усиление агрегации эритроцитов у пациентов с артериальной гипертензией (в том числе с различными осложнениями) по сравнению со здоровыми донорами, не противоречат нашим выводам [12–17].

Так, в работе И.Н. Медведева и соавт. [12] проведен масштабный анализ (380 пациентов с артериальной гипертензией и дислипидемией), в котором с помощью светового микроскопа в камере Горяева получено статистически значимое повышение параметров агрегации на 64% по сравнению с нормой. В работах N. Lebensohn и соавт., M. Delannoia и соавт. [13, 14] методом оптической микроскопии показано, что фактор формы агрегатов у пациентов с артериальной гипертензией выше, чем в контрольной группе, то есть размеры образующихся агрегатов в среднем больше. Также в статье N. Lebensohn и соавт. [13] продемонстрировано, что дзета-потенциал мембраны эритроцита у больных ниже, что, по-видимому, обусловлено различиями в биохимическом составе мембран эритроцитов больных и здоровых людей. По данным L. Bogar и соавт., A.F. Guedes и др. [15, 16], артериальная гипертензия в большинстве случаев сопровождается повышенным содержанием фибриногена и усиленной агрегацией эритроцитов.

Одним из ограничений проведенного исследования является относительно небольшое количество пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом второго типа; в дальнейшем мы планируем увеличить количество пациентов этой группы. Кроме того, в данной группе не проводились измерения методом лазерного пинцета. Мы

также планируем увеличить количество рассматриваемых групп: в частности, выделить группу пациентов с метаболическим синдромом, учитывая повышенную агрегацию эритроцитов у пациентов с этой патологией [17].

Важно отметить, что течение крови зависит не только от свойств эритроцитов, но и от свойств других ее компонентов и процессов, связанных с ними. Например, активация и агрегация тромбоцитов повышают вязкость крови, а также косвенно влияют на агрегацию эритроцитов, но эти процессы никак не учитывались в данной работе.

Заключение

Между микрореологическими параметрами крови (AI, $T_{1/2}$ и T_{agg}) пациентов с артериальной гипертензией, артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа и здоровых доноров имеются статистически значимые отличия. У пациентов с артериальной гипертензией выявлено статистически значимое усиление агрегации эритроцитов. Эти отличия выражены сильнее у пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа. Результаты, полученные различными оптическими методами *in vitro* и *in vivo*, согласуются между собой. Так, у подгруппы пациентов с пониженной средней скоростью капиллярного кровотока отмечены повышенный индекс агрегации и пониженное время агрегации эритроцитов.

Конфликт интересов

А.И. Масляницына заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.М. Каданова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Незнанов заявляет об отсутствии конфликта интересов. П.Б. Ермолинский заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.И. Гурфинкель заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Пигуренко заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.И. Дячук заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Луговцов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Приезжев заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 18-15-00422.

Информация об авторах

Масляницына Анастасия Игоревна, студентка 4-го курса физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация; ORCID 0000-0003-3910-0335

Каданова Ирина Михайловна, студентка 4-го курса физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Author Information Form

Maslianitsyna Anastasia I., a 4-year student of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; ORCID 0000-0003-3910-0335

Kadanova Irina M., a 4-year student of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Незнанов Антон Игоревич, студент 4-го курса физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Ермолинский Петр Борисович, студент 1-го курса магистратуры физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Гурфинкель Юрий Ильич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией микроциркуляции крови отдела внутренних болезней Медицинского научно-образовательного центра федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1882-4329

Пигуренко Александра Алексеевна, студентка 4-го курса факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Дячук Лариса Ивановна, кандидат медицинских наук, заведующая кардиологическим отделением Медицинского научно-образовательного центра федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Луговцов Андрей Егорович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Международного учебно-научного лазерного центра и физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-5222-8267

Приезжев Александр Васильевич, кандидат физико-математических наук, доцент и руководитель лаборатории биомедицинской фотоники физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4216-7653

Neznanov Anton I., a 4-year student of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Ermolinskiy Petr B., a 1-year master's student of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Gurfinkel Yuri I., PhD, leading researcher, Head of the Blood Microcirculation Laboratory, Department of Internal Diseases of the Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1882-4329

Pigurenko Alexandra A., a 4-year student of the Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Dyachuk Larisa I., PhD, Head of the Cardiology Department at the Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Lugovtsov Andrei E., PhD, senior researcher at the International Educational and Scientific Laser Center and the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-5222-8267

Priezzhev Alexander V., PhD, Associate Professor, Head of the Biomedical Photonics Laboratory at the International Educational and Scientific Laser Center and the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4216-7653

Вклад авторов в статью

МАИ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КИМ – получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

НАИ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЕПБ – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГЮИ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

MAI – data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KIM – data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

NAI – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

EPB – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GYU – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ПАА – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ДЛИ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЛАЕ – интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ПАВ – интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

PAА – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

DLI – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAЕ – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

PAV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tibiriçá E., Lorenzo A., Oliveira G.M.M. Microcirculation and Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol.* 2018; 111(2):120–121. doi:10.5935/abc.20180149
2. Gurfinkel Yu.I., Sasonko M.L., Priezzhev A.V. Digital capillaroscopy as important tool for early diagnostics of arterial hypertension. *Proc. SPIE.* 2014; 9448:117. doi:10.1117/12.2180259
3. Сайт Международной организации по диабету. Режим доступа: www.idf.org/diabetesatlas (дата обращения 12.04.2020).
4. Frisbee J.C. Obesity, insulin resistance, and microvessel density. *Microcirculation.* 2007; 14(4-5):289-98.
5. Shin S., Yang Y., Suh J.S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009; 41(3):197–207. doi:10.3233/CH-2009-1172.
6. Лопатин В.Н., Приезжев А.В., Апонасенко А.Д., Шепелевич Н.В., Лопатин В.В., Пожиленкова П.В., Простакова И.В. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. М.: Физматлит; 2004. 384 с.
7. Ermolinskiy P.B., Lugovtsov A.E., Maslyanitsina A.I., Semenov A.N., Dyachuk L.I., Priezzhev A.V. Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers. *J. of Biomedical Photonics & Eng.* 2018; 4(3):030303.
8. Ли Кисун. Взаимодействие эритроцитов в средах, индуцирующих их агрегацию: исследование с помощью лазерных пинцетов. дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.; 2016.
9. Gurfinkel Yu.I., Priezzhev A.V., Sasonko M.L., Kuznetsov M.I. Importance of image processing in digital optical capillaroscopy for early diagnostics of arterial hypertension. In: *BioPhotonics, 2015 International Conference Proceedings. Florence (Italy) 20–22, p.1–4.*
10. Baskurt O.K., Boynard M., Cokélet G.C., Connes P., Cooke B.M., Forconi S. et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods.* 2009; 42(2):75–97. doi: 10.3233/CH-2009-1202.
11. Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Масляницына А.И., Семенов А.Н., Дячук Л.И., Приезжев А.В. Оценка микрореологических свойств эритроцитов *in vitro* в норме и патологии с помощью оптических методов. *Series on Biomechanics.* 2018; 32(3):20–25. 12. Медведев И.Н., Скоряткина И.А., Завалишина С.Ю. Сосудистый контроль над агрегацией форменных элементов крови у больных артериальной гипертензией с дислипидемией. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2016; 15(1):4–9. doi:10.15829/1728-8800-2016-1-4-9
13. Lebensohn N., Re A., Carrera L., Barberena L., D'Arrigo M., Foresto P. Serum sialic acid, cellular anionic charge and erythrocyte aggregation in diabetic and hypertensive patients. *Medicina (B Aires).* 2009; 69(3):331–334.
14. Delannoya M., Fontanaa A., D'Arrigob M., Riquelmea B. Influence of Hypertension and Type 2 Diabetes Mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series on Biomechanics.* 2015; 29(1):1–6.
15. Bogar L. Hemorheology and hypertension: not "chicken or egg" but two chickens from similar eggs. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2002; 26(2):81–83.
16. Guedes A.F., Carvalho F.A., Moreira C., Nogueira J.B., Santos N.C. Essential arterial hypertension patients present higher cell adhesion forces, contributing for fibrinogen-dependent cardiovascular risk. *Nanoscale,* 2017; 9(39):14897–14906. doi: 10.1039/C7NR03891G.
17. Сидельникова Н.С., Якусевич В. В., Петроченко А. С., Тихомирова И. А., Петроченко Е. П. Особенности реологических и микроциркуляторных показателей у пациентов с метаболическим синдромом. *Ярославский педагогический вестник.* 2012; 2:91–97.

REFERENCES

1. Tibiriçá E., Lorenzo A., Oliveira G.M.M. Microcirculation and cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol.* 2018; 111(2):120–121. doi:10.5935/abc.20180149
2. Gurfinkel Yu.I., Sasonko M.L., Priezzhev A.V. Digital capillaroscopy as important tool for early diagnostics of arterial hypertension. *Proc. SPIE.* 2014; 9448:117. doi:10.1117/12.2180259
3. The link on the International Diabetes Federation website. Available at: www.idf.org/diabetesatlas (accessed 12.04.2020).
4. Frisbee J.C., Obesity, insulin resistance, and microvessel density. *Microcirculation.* 2007 Jun-Jul;14(4-5):289-98.
5. Shin S., Yang Y., Suh J.S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009; 41(3):197–207. doi:10.3233/CH-2009-1172.
6. Lopatin V.N., Priezzhev A.V., Aponasenko A.D., Shepelevich N.V., Lopatin V.V., Pozhilenkova P.V., Prostakova I.V. *Metody svetorassejaniya v analize dispersnyh biologicheskikh sred.* Moscow: Fizmatlit, 2004. 384 p. (In Russian)
7. Ermolinskiy P.B., Lugovtsov A.E., Maslyanitsina A.I., Semenov A.N., Dyachuk L.I., Priezzhev A.V. Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers. *J. of Biomedical Photonics & Eng.* 2018; 4(3):030303.
8. Lee Kisung. *Vzaimodejstvie eritrocitov v sredah, inducirujushchih ih agregaciju: issledovanie s pomoshchju lazernyh pincetov.* [dissertation] Moscow; 2016. (In Russian)

8. Lee Kisung. Vzaimodejstvie eritrocitov v sredah, inducirujushchih ih agregaciju: issledovanie s pomoshchju lazernyh pincetov. [dissertation] Moscow; 2016. (In Russian)
9. Gurfinkel Yu.I., Priezzhev A.V., Sasonko M.L., Kuznetsov M.I. Importance of image processing in digital optical capillaroscopy for early diagnostics of arterial hypertension. In: BioPhotonics, 2015 International Conference Proceeding. Florence (Italy) 20–22, p.1–4.
10. Baskurt O.K., Boynard M., Cokelet G.C., Connes P., Cooke B.M., Forconi S. et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods. 2009; 42(2):75–97. doi: 10.3233/CH-2009-1202.
11. Ermolinskiy P.B., Lugovtsov A.E., Maslyanitsina A.I., Semenov A.N., Dyachuk L.I., Priezzhev A.V. In vitro assessment of microrheological properties of erythrocytes in norm and pathology with optical methods. Ser. Biomech. 2018; 32(3):20–25.
12. Medvedev I.N., Skorjatina I.A., Zavalishina S.Y. Vascular control over blood cells aggregation in patients with arterial hypertension with dyslipidemia. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2016;15(1):4-9. (In Russian) doi: 10.15829/1728-8800-2016-1-4-9
13. Lebensohn N., Re A., Carrera L., Barberena L., D'Arrigo M., Foresto P. Serum sialic acid, cellular anionic charge and erythrocyte aggregation in diabetic and hypertensive patients. Medicina (B Aires). 2009; 69(3):331–4.
14. Delannoya M., Fontanaa A., D'Arrigob M., Riquelmea B. Influence of Hypertension and Type 2 Diabetes Mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. Series on Biomechanics. 2015; 29(1):1–6.
15. Bogar L. Hemorheology and hypertension: not "chicken or egg" but two chickens from similar eggs. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2002; 26(2):81–83.
16. Guedes A.F., Carvalho F.A., Moreira C., Nogueira J.B., Santos N.C. Essential arterial hypertension patients present higher cell adhesion forces, contributing for fibrinogen-dependent cardiovascular risk. Nanoscale, 2017; 9(39):14897–14906. doi: 10.1039/C7NR03891G.
17. Sidelnikova N.S., Jakusevich V. V., Petrochenko A. S., Tihomirova I. A., Petrochenko E.P. Osobennosti reologicheskikh i mikrocirkuljatornyh pokazatelej u pacientov s metabolicheskim sindromom. (In Russ.) Jaroslavskij pedagogicheskij vestnik. 2012; 2: 91–97.

Для цитирования: А.И. Масляницына, И.М. Каданова, А.И. Незнанов, П.Б. Ермолинский, Ю.И. Гурфинкель, А.А. Пигуренко, Л.И. Дячук, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев. Микрореологические свойства крови и капиллярный кровоток при артериальной гипертензии и сахарном диабете второго типа: исследование оптическими методами *in vitro* и *in vivo*. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9 (2): 53-63. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-53-63

To cite: A.I. Maslyanitsyna, I.M. Kadanova, A.I. Neznanov, P.B. Ermolinskiy, Yu.I. Gurfinkel, A.A. Pigurenko, L.I. Dyachuk, A.E. Lugovtsov, A.V. Priezzhev. Microrheologic properties of blood and capillary blood flow in case of arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus: *in vitro* and *in vivo* optical assessment. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2020; 9 (2): 53-63. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-53-63