УДК 616–076

ГОРШКОВ А. Ю., ГУМАНОВА Н. Г., БОЙЦОВ С. А.

Темнопольная микроскопия в изучении эндотелиального гликокаликса: первый российский опыт; воспроизводимость метода

Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины
101990, Россия, Москва, Петроверигский пер., 10, стр. 3
e-mail: AGorshkov@gnicpm.ru

Реферат

Введение и цель исследования. **Повреждение эндотелиального гликокаликса является одним из первых патогенетических механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний. На основе темнопольной микроскопии разработан метод изучения эндотелиального гликокаликса (ЭГК), определяющий глубину проникновения эритроцитов в его толщу — пограничную область перфузии (ПОП). Цель работы состояла в апробации и валидации метода изучения ЭГК, основанного на принципе темнопольной микроскопии.**

Материалы и методы. **В исследовании приняли участие 38 здоровых добровольцев в возрасте от 28 до 65 лет (мужчин n=20, женщин n=18). ЭГК изучали путем измерения ширины ПОП на основе цифровых видеозаписей микрососудов слизистой оболочки подъязычной локализации.**

Результаты исследования и их обсуждение. **Оценена воспроизводимость измерения ПОП в зависимости от области сублингвальной локализации и длительности временного интервала между измерениями. Коэффициент вариации (CV) измерений не превышает 10 %. Измерения не зависят от временных интервалов между исследованиями и от области сублингвальной локализации. Показатель ширины ПОП не связан с полом.**

Выводы. **Метод изучения ЭГК прошел первый этап валидации, показав хорошую реализуемость и переносимость пациентами, а также высокую воспроизводимость измерений, которые не зависят от области исследования и временных промежутков между измерениями.**

Ключевые слова: *эндотелиальный гликокаликс, темнопольная микроскопия, сердечно-сосудистые заболевания, диагностика.*

Введение

Эндотелиальный гликокаликс (ЭГК), являющийся естественным ангиопротектором, представляет крайний интерес для современных исследователей с точки зрения оценки его потенциальных предикторных возможностей как нового биомаркера, который мог бы способствовать стратификации сердечно-сосудистого риска на индивидуальном уровне [1], диагностике дисфункции эндотелия (ДЭ), а также мониторингу эффективности терапевтических воздействий, направленных на сохранение и восстановление ЭГК. В целях повышения эффективности первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний весьма актуальна и привлекательна идея внедрения в практику неинвазивного, оптимального по трудо- и времязатратности, воспроизводимого метода оценки функционального состояния ЭГК.

Рабочей группой Европейского общества кардиологов по периферическому кровообращению определено два технологически различных направления для оценки состояния ЭГК с целью диагностики ДЭ.

Первое направление связано с использованием инвазивного метода оценки системного объема ЭГК (всего сосудистого русла) путем введения декстрана 40 кДа и флуоресцентно меченных эритроцитов. Инвазивный характер и трудоемкая подготовка для определения системного объема ЭГК лимитируют использование метода на больших когортах.

Второе направление связано с использованием неинвазивных, автоматических методов (основанных на принципах ортогональной поляризационной и темнопольной боковой микроскопиях) с высокой пропускной способностью пациентов для изучения ЭГК сублингвальной локализации [5].

В настоящее время активно внедряемым и широко используемым подходом для изучения ЭГК является использование темнопольной микроскопии с расчетом в автоматическом режиме глубины проникновения эритроцитов в толщу ЭГК микрососудов — пограничной области перфузии (ПОП). Физиологическим основанием для оценки ПОП является вазопротективная роль ЭГК, реализующаяся в лимитировании тесных контактов эритроцитов и апикальной поверхности эндотелиальных клеток [8]. Установлено, что поврежденный ЭГК допускает более глубокое проникновение эритроцитов к эндотелиальной поверхности, что отражается в росте значения ПОП [8]. Использование темнопольной микроскопии с расчетом ПОП применялось в исследованиях у пациентов с различными нозологиями: сахарным диабетом [4], терминальной почечной недостаточностью [8], сепсисом [3], сердечно-сосудистыми заболеваниями [2, 6, 7].

Несмотря на популяризацию данного метода оценки ЭГК в различных клинических и эксперимен-

тальных моделях, информации в научной литературе о переносимости исследования, воспроизводимости значений, получаемых полностью автоматизированным методом, крайне мало.

Цель исследования состояла в апробации и валидации метода исследования ЭГК, основанного на измерении ширины пограничной области перфузии эритроцитов. Валидация метода базировалась на оценке его реализуемости, переносимости и воспроизводимости в зависимости от области сублингвальной локализации, в которой проводили измерение (исследование 1); временных интервалов между измерениями (исследование 2). Метод апробировали на мужчинах и женщинах с целью выявления гендерных различий измеряемого параметра ПОП (исследование 3).

Материал и методы исследования

В исследование включены 38 здоровых добровольцев в возрасте от 28 до 65 лет (мужчин n=20, женщин n=18), обратившихся в ФГБУ «ГНИЦ ПМ» для профилактического консультирования и прошедших следующее обследование: сбор анамнеза, изучение медицинской документации, объективный осмотр, в т. ч. антропометрические измерения (определение роста, массы тела, ИМТ, окружности талии), оценка уровня артериального давления и частоты сердечных сокращений, дуплексное сканирование сонных артерий, осмотр стоматолога. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями исключения из исследования служили клинические проявления атеросклероза любой локализации; верифицированное асимптомное атеросклеротическое поражение сонных артерий по данным дуплексного сканирования; артериальная гипертензия любой степени (и/или регулярный прием гипотензивной терапии); острое воспалительное заболевание, включая воспалительные процессы ротовой полости; онкологические заболевания; болезни крови и кроветворных органов; сахарный диабет любого генеза; хроническая почечная и печеночная недостаточность; беременность; курение.

Стандартные условия измерения ПОП

Условия проведения капилляроскопического исследования были одинаковы для всех пациентов. Исследование проводили натощак, в утренние часы, в полутемном кабинете при постоянной температуре в помещении +21±1°С. За 4–6 часов до исследования участнику было рекомендовано воздержаться от физической нагрузки, курения, приема кофеина. После 10 минутного отдыха в положении сидя осуществляли две последовательные (с интервалом в 5 минут) видеозаписи сублингвального капиллярного кровотока. Во время записи исследуемый, установив локти на поверхность стола, держал своими руками неподвижно капилляроскоп в ротовой полости. Контролировался легкий (касательный) контакт одноразовой насадки оптического зонда и слизистой дна полости рта сублингвальной локализации слева от уздечки языка во время первой записи и справа во время второй (рис. 1).

Инструментальное исследование

ЭГК изучали путем измерения ПОП на основе цифровых видеозаписей микрососудов слизистой оболочки подъязычной локализации. Видеозапись проводили с использованием темнопольного капилляроскопа со светодиодным освещением в зеленой области спектра (длина волны 525 нм) фирмы KK Research Technology Ltd (Honiton Town, Devon, United Kingdom) (рис. 2).

Рис. 1. Положение пациента во время исследования. Установив локти на поверхность стола, исследуемый держит своими руками неподвижно капилляроскоп в ротовой полости. Контролируется легкий (касательный) контакт одноразовой насадки оптического зонда и слизистой сублингвальной локализации. Четкость изображения корректируется фокусировочным кольцом

Рис. 2. Темнопольный капилляроскоп. Составными элементами капилляроскопа являются корпус, оптический зонд, фокусировочное кольцо, сменные одноразовые насадки для оптического зонда

Являясь портативным ручным устройством, капилляроскоп состоит из следующих частей: корпус, оптический зонд, фокусировочное кольцо, сменные одноразовые насадки для оптического зонда (рис. 1). Данное устройство обеспечивает цифровую запись капиллярного кровотока с 325-кратным увеличением и разрешением 752×480 пиксель при скорости записи 25 кадров в секунду.

Далее, используя программное обеспечение GlycoCheckTM (Glycocheck BV, Маастрихт, Нидерланды), в автоматическом режиме осуществляли анализ полученных записей капиллярного кровотока с расчетом значения ПОП. Алгоритм работы программного обеспечения будет рассмотрен ниже.

Видеозапись кровотока начиналась автоматически и проводилась при условии достижения оптимального качества изображения, определяемого интенсивностью отраженного света, оптимальной фокусировкой, амплитудой движения оптического зонда в пределах допустимых норм (рис. 3 А).

Во время видеозаписи автоматически идентифицируются микрососуды диаметром от 5 до 25 мкм, в которых через каждые 10 мкм вдоль направления хода сосуда определяются сосудистые сегменты. При достижении суммарного количества сегментов более 3000 запись прекращалась.

Средняя продолжительность видеозаписи составляла 2–3 минуты и состояла из нескольких видеофрагментов по 40 кадров каждый. По завершении видеозаписи автоматически в каждом записанном сосудистом сегменте с шагом в 0,5 мкм вдоль направления сосуда размещается 21 маркерная линия.

Статистический анализ изображения

Дальнейшему анализу программным обеспечением GlycoCheckTM подвергались сосудистые сегменты, имеющие в первом кадре каждого видеофрагмента сигнал от проходящих эритроцитов минимум в 11 (из 21) маркерных линиях (отмечены зеленым); сегменты, не удовлетворяющие данному условию, исключались из дальнейшего анализа (отмечены желтым) (рис. 3 В).

После контроля качества полученных изображений в каждом сосудистом сегменте видеофрагмента автоматически выполняется 840 измерений (21 поперечное сечение ×40 кадров) ширины колонки проходящих эритроцитов. Затем для каждого сегмента все измерения ширины колонки проходящих эритроцитов объединяются в виде графика, где число наблюдаемых позиций эритроцитов (процент от общего) откладывают по шкале Y, а значения ширины колонки эритроцитов (в мкм) — по оси X. На данном графике определяют медиану ширины колонки эри-

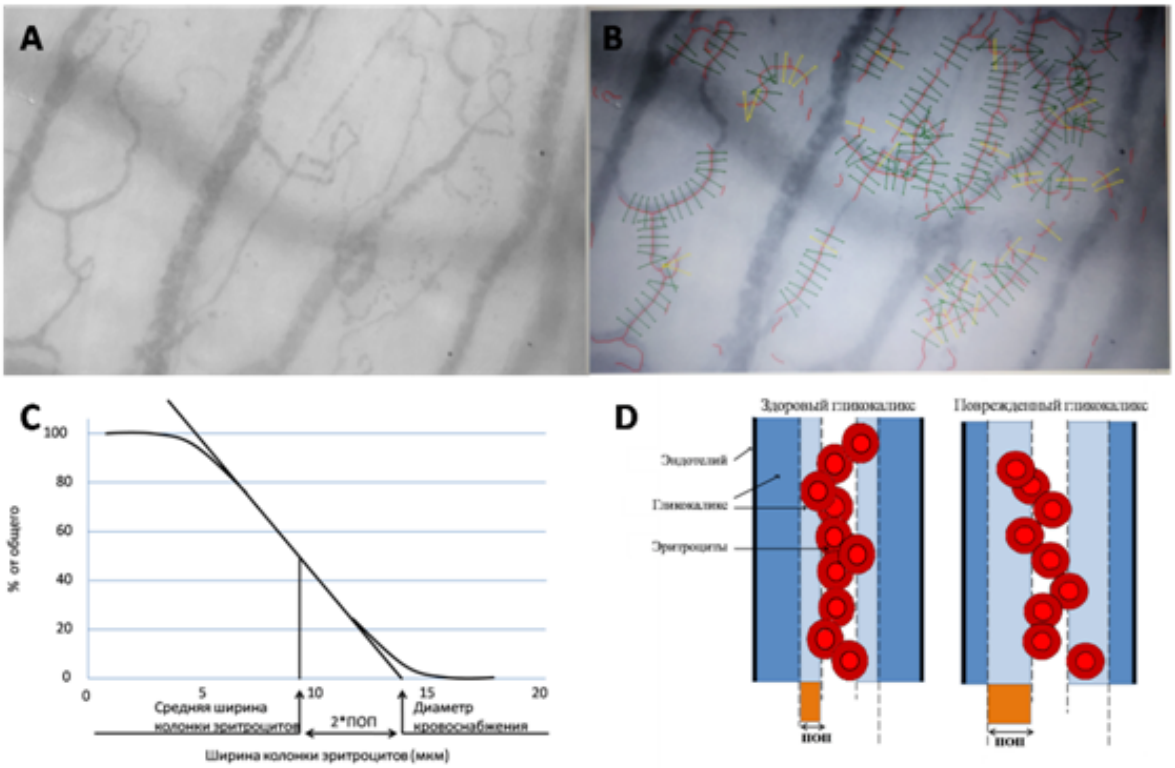

Рис. 3. Алгоритм расчета пограничной области перфузии. А) Видеозапись потока эритроцитов. Эритроциты определяются путем отражения светодиодного освещения в зеленой области спектра от гемоглобина. В) Через каждые 10 мкм вдоль направления хода сосуда автоматически определяются сосудистые сегменты. Сегменты, имеющие в первом кадре каждого видеофрагмента сигнал от проходящих эритроцитов, как минимум, в 11 (из 21) маркерных линиях (отмечены зеленым); сегменты, не удовлетворяющие данному условию, исключались из дальнейшего анализа (отмечены желтым). С) Все измерения ширины колонки проходящих эритроцитов объединяются в виде графика. Методом линейной регрессии анализируют участок кривой между 25-м и 75-м перцентилем с расчетом средней ширины колонки эритроцитов, диаметра перфузии, пограничной области перфузии (ПОП). D) ПОП представляет собой амплитуду бокового отклонения эритроцитов от средней ширины колонки проходящих эритроцитов. Поврежденный ЭГК допускает более глубокое проникновение эритроцитов к эндотелиальной поверхности, что отражается в росте значения ПОП

троцитов, которая соответствует 50-му перцентилю кривой. Далее методом линейной регрессии анализируют участок кривой между 25-м и 75-м перцентилем. Точка пересечения регрессионной прямой с осью X представляет собой амплитуду наибольшего отклонения эритроцитов от их прямолинейного движения. Данный расчетный параметр характеризует диаметр перфузии (рис. 3 C).

Далее, используя уравнение (диаметр перфузии — средняя ширина колонки эритроцитов)/2, рассчитывается значение ПОП для каждого сосудистого сегмента и выражается в мкм. Таким образом, ПОП представляет собой амплитуду бокового отклонения эритроцитов от средней ширины колонки проходящих эритроцитов (рис. 3 D). На заключительном этапе все расчетные значения ПОП, соответствующие для столбцов эритроцитов шириной от 5 до 25 мкм, усредняются для обеспечения единого значения ПОП для каждого обследуемого пациента.

Исследование 1: Воспроизводимость измерения ПОП в зависимости от области сублингвальной локализации.

В исследование 1 для оценки воспроизводимости измерения ПОП в зависимости от области сублингвальной локализации были включены 34 здоровых добровольца в возрасте от 40 до 65 лет.

При соблюдении одинаковых условий с интервалом в 5 минут определяли значения ПОП микроциркуляторного русла слизистой дна полости рта сублингвальной локализации слева от уздечки языка во время первой записи и справа во время второй.

Исследование 2: Воспроизводимость измерения ПОП в зависимости от временных интервалов между измерениями.

В исследование 2 для оценки воспроизводимости метода измерения ПОП в зависимости от длительности временного интервала между измерениями были включены 4 здоровых добровольца мужского пола (2 добровольца в возрасте 28 лет и 2 добровольца в возрасте 29 лет).

Значения ПОП определяли дважды для каждого цикла измерения с временными интервалами по следующей схеме: первый цикл измерений — отдых 15 минут → второй цикл измерений — отдых 30 минут → третий цикл измерений — отдых 60 минут → четвертый цикл измерений. Спустя сутки исследование повторяли по указанной схеме.

Исследование 3: Анализ гендерных различий измеряемого параметра ПОП.

Для оценки возможных гендерных влияний на значение ширины ПОП сублингвальной локализации в исследование были включены 34 здоровых добровольца (18 женщин и 16 мужчин) в возрасте от 40 до 65 лет.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде среднего (M)±стандартное отклонение (SD). Для оценки относительной меры разброса данных использовали коэффициент вариации (CV, %), который рассчитывали по уравнению SD/M×100 %. Сравнение групп проводили с помощью пакета программ Statistica software, версия 8, нулевую гипотезу проверяли по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни. Уровень значимости p менее 0,05 ($p<0,05$) расценивали как достоверный.

Результаты исследования и их обсуждение

Реализуемость и переносимость исследования.

Продолжительность обследования на аппарате Glucochek с подготовкой больного, вводом паспортных данных и получением заключения не превышала 15 минут. Результаты нашей работы свидетельствуют о хорошей переносимости пациентами исследования микроциркуляторного русла, никаких побочных реакций не выявлено. Ограничением для проведения исследования у двух добровольцев послужили тремор рук и нижней челюсти, лимитировавшие качественную запись микрокровотока. Таким образом, реализуемость (отношение количества правильно выполненных исследований к общему количеству исследований) данного метода исследования составила 95 %.

Исследование 1: Воспроизводимость измерения ПОП в зависимости от области сублингвальной локализации.

Клиническая характеристика группы обследованных добровольцев представлена в таблице 1.

В таблице 2 указаны абсолютные значения ПОП, полученные слева и справа от уздечки языка, их дельта, средние значения и стандартные отклонения для пары последовательно выполненных измерений. Значения ширины ПОП колебались от минимальных 1,48 мкм слева от уздечки языка и от 1,29 мкм справа до максимальных 2,11и 2,00 мкм соответственно.

Клиническая характеристика группы

Таблица 1

Показатель	Добровольцы (n=34)
возраст, лет	51±8
индекс массы тела, кг/м^2	26,1±3,5
окружность талии, см	90±10
систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	125±10
диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	79±5
пульсовое артериальное давление, мм рт. ст.	47±8
частота сердечных сокращений, уд./мин	65±8

Показатель ПОП, мкм и его коэффициент вариации у здоровых добровольцев в зависимости от области сублингвальной локализации

Таблица 2

№ Доброволь-ца	ПОП слева от уздечки языка, мкм	ПОП справа от уздечки языка, мкм	M±SD	Δ	CV, %	№ Доброволь-ца	ПОП слева от уздечки языка, мкм	ПОП справа от уздечки языка, мкм	M±SD	Δ	CV, %
1	1,94	2	1,97±0,04	0,06	2,2	19	1,79	1,64	1,71±0,11	0,15	6,2
2	1,97	2	1,98±0,02	0,03	1,1	20	1,66	1,62	1,64±0,03	0,04	1,7
3	1,49	1,6	1,55±0,08	0,11	5	21	1,56	1,79	1,67±0,16	0,23	9,7
4	1,92	1,85	1,89±0,05	0,07	2,6	22	1,73	1,7	1,72±0,02	0,03	1,2
5	1,79	1,63	1,71±0,11	0,16	6,6	23	1,81	1,69	1,75±0,08	0,12	4,8
6	2,11	1,86	1,98±0,18	0,25	8,9	24	1,8	2,03	1,91±0,16	0,23	8,5
7	1,72	1,49	1,6±0,16	0,23	10,2	25	1,58	1,29	1,43±0,21	0,29	14,3
8	1,79	1,69	1,73±0,07	0,10	4,1	26	1,62	1,5	1,56±0,08	0,12	5,4
9	1,78	1,67	1,72±0,08	0,11	4,5	27	1,59	1,69	1,64±0,07	0,10	4,3
10	1,95	1,82	1,88±0,09	0,13	4,9	28	1,91	2,08	2±0,12	0,17	6
11	1,87	1,64	1,75±0,16	0,23	9,3	29	1,72	1,73	1,72±0,01	0,01	0,4
12	1,85	2,02	1,94±0,12	0,17	6,2	30	1,87	1,8	1,84±0,05	0,07	2,7
13	1,48	1,92	1,7±0,31	0,44	18,3	31	1,93	2,04	1,98±0,08	0,11	3,9
14	1,92	1,78	1,85±0,1	0,14	5,4	32	1,91	1,56	1,74±0,25	0,35	14,2
15	1,83	1,83	1,83±0	0,00	0	33	2,11	1,88	1,99±0,16	0,23	8,2
16	2,05	1,74	1,89±0,22	0,31	11,6	34	1,68	1,76	1,72±0,06	0,08	3,3
17	1,87	1,95	1,91±0,06	0,08	3	—	—	—	—	—	—
18	1,91	1,77	1,84±0,1	0,14	5,4	—	—	—	—	—	—

Среднее значение ширины ПОП составило слева 1,81 мкм, справа 1,77 мкм и значимо не различалось (p=0,30). Наибольшая разница между двумя значениями ширины ПОП, последовательно полученными в различных сублингвальных областях у добровольца, составила 0,44 мкм, определившая наибольший коэффициент вариации между значениями ПОП в различных сублингвальных областях в 18,3 %. Средний коэффициент вариации между значениями ПОП микроциркуляторного русла различных областей сублингвальной локализации составил 6,0 %.

Полученные нами данные согласуются с результатами работы Fouad Amraoui и соавторов, которые продемонстрировали, что при пяти последовательных измерениях ПОП в 4-х различных квадрантах подъязычной области средний коэффициент вариации составляет 11,9 % [2].

Таким образом, рассчитанные коэффициенты вариации свидетельствуют о незначительной вариабельности и высокой воспроизводимости последовательно полученных значений ПОП в различных областях сублингвальной локализации.

Основываясь на полученных данных, мы полагаем, что выбор области сублингвальной локализации для проведения исследования (справа или слева от уздечки языка) не имеет принципиального значения, а для расчета ПОП достаточно одного исследования. Однако с целью повышения достоверности получаемых данных, принимая во внимание опыт других исследователей, мы рекомендуем проведение двух последовательных исследований, с расчетом среднего значения ПОП для каждого обследуемого.

Исследование 2: Воспроизводимость измерения ПОП в зависимости от временных интервалов между измерениями.

Во второй части нашего исследования, выполненной с участием другой группы добровольцев (n=4), были подтверждены результаты, полученные в исследовании 1. Так, средний внутрисерийный CV для всех выполненных пар измерений составил 6,2 % (табл 3).

Далее, для оценки воспроизводимости получаемых значений ПОП через фиксированные промежутки времени для каждого дня мы рассчитали межсерийные коэффициенты вариации для каждого интервала времени относительно исходного измерения (на основе 4-х измерений) (табл 4).

Из данных таблицы 4 видно, что межсерийный коэффициент вариации находился в диапазоне от 1,8 до 10,7 %, а средние его значения для каждого временного интервала относительно исходного измерения внутри суток колебались от 6,4 до 8,5 %.

Учитывая выявленную отличную межсерийную воспроизводимость внутри суток, мы пришли к выводу, что для расчета ПОП нет необходимости в выполнении повторных циклов исследований через различные интервалы времени.

Показатель ПОП, мкм и его коэффициент вариации у здоровых добровольцев в зависимости от длительности временного интервала между измерениями

Таблица 3

№ добро-вольца	Параметр	1-е сутки				2-е сутки			
		Исход. измерение	Через 15 минут	Через 30 минут	Через 60 минут	Исход. измерение	Через 15 минут	Через 30 минут	Через 60 минут
35	ПОП, мкм (среднее из двух измер.±SD)	1,88±0,01	2,02±0,18	1,82±0,09	2,15±0,13	1,89±0,09	1,80±0,07	1,95±0,03	2,14±0,09
	CV, % внутри-серийный	0,8	9,1	5,1	5,9	4,9	3,9	1,5	4,3
36	ПОП, мкм (среднее из двух измер.±SD)	1,74±0,06	1,52±0,20	1,70±0,18	1,98±0,13	1,80±0,15	1,83±0,27	1,93±0,01	1,62±0,07
	CV, % внутри-серийный	3,3	13,0	10,8	6,4	8,3	14,7	0,4	4,4
37	ПОП, мкм (среднее из двух измер.±SD)	1,88±0,21	2,00±0,05	1,89±0,28	2,14±0,06	1,85±0,18	1,63±0,04	1,62±0,17	1,74±0,02
	CV, % внутри-серийный	10,9	2,5	15,0	3,0	9,9	2,6	10,5	1,2
38	ПОП, мкм (среднее из двух измер.±SD)	2,01±0,12	1,75±0,06	2,01±0,11	1,97±0,06	1,69±0,01	1,73±0,04	1,87±0,03	1,75±0,04
	CV, % внутри-серийный	6	3,7	5,6	3,2	0,8	2,1	1,5	2,4
CV, % внутри-серийный средний для каждого временного интервала		5,3	7,1	9,1	4,6	6,0	5,8	3,5	3,1

Коэффициенты вариации показателя ПОП у здоровых добровольцев в зависимости от длительности временного интервала между измерениями

Таблица 4

№ Добровольца	CV, %, через различные временные промежутки, относительно исходного измерения соответствующего дня					
	1-е сутки, временной интервал			2-е сутки, временной интервал		
	Δ15 минут	Δ30 минут	Δ60 минут	Δ15 минут	Δ30 минут	Δ60 минут
35	6,9	3,6	8,6	4,5	3,5	8,1
36	10,7	6,6	8,6	9,8	6,1	8,1
37	7,2	10,7	9,7	9,6	10,2	7,0
38	9,0	4,7	4,1	1,8	5,9	2,5
CV, % средний межсерийный для каждого временного интервала	8,5	6,4	7,8	6,4	6,4	6,4

Параметр ПОП и его коэффициент вариации в пределах суток

Таблица 5

№ добровольца	Параметр	1 сутки	2 сутки
35	Пограничная область перфузии, мкм (среднее всех измерений±SD)	1,97±0,17	1,94±0,14
	CV, %, внутри суток	8,4	7,4
36	Пограничная область перфузии, мкм (среднее всех измерений±SD)	1,74±0,21	1,79±0,17
	CV, %, внутри суток	12,1	9,4
37	Пограничная область перфузии, мкм (среднее всех измерений±SD)	1,97±0,18	1,71±0,14
	CV, %, внутри суток	8,9	8,1
38	Пограничная область перфузии, мкм (среднее всех измерений±SD)	1,93±0,14	1,76±0,08
	CV, %, внутри суток	7,1	4,3
Средний CV, % внутри суток	9,1	7,3	—

Параметр ПОП, мкм и его коэффициент вариации с временным интервалом в 24 часа

Таблица 6

№ добровольца	1-е сутки	2-е сутки	CV, % между измерениями в различные дни
	Пограничная область перфузии, мкм (среднее из всех измерений±SD)		
35	1,97±0,17	1,94±0,14	7,7
36	1,74±0,21	1,79±0,17	10,5
37	1,97±0,18	1,71±0,14	11,1
38	1,93±0,14	1,76±0,08	7,5
Средний CV, %, между измерениями в различные дни	—	—	9,2

Клиническая характеристика групп

Таблица 7

Показатель	Женщины (n=18)	Мужчины (n=16)
возраст, лет	52±9	49±7
индекс массы тела, кг/м^2	25,8±3,7	26,4±3,3
систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	122±10	130±8*
диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	77±5	81±4*
пульсовое артериальное давление, мм рт. ст.	45±9	49±7
частота сердечных сокращений, уд./мин	65±7	65±9

Примечание: * — достоверность отличия показателей ($p<0,05$).

Для всех полученных значений ПОП внутри суток средний коэффициент вариации составил 9,1 % в первые сутки, 7,3 % во вторые сутки (табл 5). Также нами был выполнен эксперимент с оценкой воспроизводимости ПОП с интервалом в 24 часа между измерениями. Результаты представлены в таблице 6. Они свидетельствуют о хорошей воспроизводимости результатов анализа ПОП с интервалом в 24 часа при соблюдении одинаковых условий. В данном случае коэффициент вариации составил 9,2 %.

Исследование 3: Анализ гендерных различий измеряемого параметра ПОП.

Для оценки возможных гендерных ассоциаций ширины ПОП сублингвальной локализации в исследование было включено 34 здоровых добровольца (18 женщин и 16 мужчин) в возрасте от 40 до 65 лет. Клиническая характеристика обследованных групп представлена в табл. 7.

Рассчитаны средние значения ПОП в зависимости от пола исследуемого (таблица 8). Средние значения параметра ПОП у мужчин и женщин значимо не различались ($p=0,21$): у женщин (n=18) — 1,82±0,13 мкм, и 1,75±0,16 мкм у мужчин (n=16).

Значения ПОП у лиц различного пола

Таблица 8

Женщины (n=18)		Мужчины (n=16)	
№ Добровольца	ПОП, мкм	№ Добровольца	ПОП, мкм
1	1,97	19	1,71
2	1,98	20	1,64
3	1,55	21	1,67
4	1,89	22	1,72
5	1,71	23	1,75
6	1,98	24	1,91
7	1,6	25	1,43
8	1,73	26	1,56
9	1,72	27	1,64
10	1,88	28	2
11	1,75	29	1,72
12	1,94	30	1,84
13	1,7	31	1,98
14	1,85	32	1,74
15	1,83	33	1,99
16	1,89	34	1,72
17	1,91	—	—
18	1,84	—	—
Для всех	1,82±0,13	—	1,75±0,16

Выводы

Результаты испытаний показали, что исследуемый нами прибор для проведения капилляроскопических исследований и прилагаемый к нему метод позволяет проводить объективную оценку функционального состояния ЭГК. Устройство обеспечивает визуализацию и обработку получаемых видеоизображений в автоматическом режиме, с расчетом пограничной области перфузии; формирует отчет о выполненном исследовании в виде текстовых и графических файлов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о высокой воспроизводимости измерений, которые не зависят от области сублингвальной локализации и от временных промежутков между измерениями. Также выявлено, что измеряемый параметр не связан с полом у здоровых добровольцев.

Неинвазивность, оптимальная трудо- и времязатратность, удовлетворительная переносимость данного метода определяют возможность проведения исследований на больших когортах.

Литература

1. Горшков А. Ю., Бойцов С. А. Эндотелиальный гликокаликс — потенциальный сосудистый биомаркер: диагностическая и терапевтическая мишень сердечно-сосудистых заболеваний/ / Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015. Т. 14. № 6. С. 87–92.

2. Amraoui F., OldeEngberink R. H., van Gorp J. et al. Microvascular glycocalyx dimension estimated by automated SDF imaging is not related to cardiovascular disease// Microcirculation. 2014. № 21(6). P. 499–505.

3. Donati A., Damiani E., Luchetti M. et al. Microcirculatory effects of the transfusion of leukodepleted or non-leukodepleted red blood cells in patients with sepsis: a pilot study// Crit Care. 2014. № 18 (1). P. R33.

4. Groen B. B., Hamer H. M., Snijders T. et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes // J. ApplPhysiol. 2014. № 116 (8). P. 998–1005.

5. Lekakis J., Abraham P., Balbarini A. et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 2011. № 18 (6). P. 775–789

6. Martens R. J., Vink H., van Oostenbrugge R. J. et al. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients // Cerebrovasc. Dis. 2013. № 35 (5). P. 451–454.

7. Mulders T. A., Nieuwdorp M., Stroes E. S. et al. Noninvasive assessment of microvascular dysfunction in families with premature coronary artery disease // Int. J. Cardiol. 2013. № 168 (5). P. 5026–5028.

8. Vlahu C. A., Lemkes B. A., Struijk D. G. et al. Damage of the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients // J. Am. Soc. Nephrol. 2012. № 23 (11). P. 1900–1908.

UDK 616–076

Gorshkov A. Yu., Gumanova N. G., Boytsov S. A.

Dark field microscopy for the endothelial glycocalyx study: first russian experience; the reproducibility of the method

National Research Center for Preventive Medicine
101000, Moscow, Petroverigskiy lane, 10
e-mail: AGorshkov@gnicpm.ru

Abstract

Introduction and purpose. **Endothelial glycocalyx is a protective structure of the vascular bed and is damaged in early stages of cardiovascular diseases. Dark field microscopy can determine the depth of penetration of red blood cells in endothelial glycocalyx to estimate the perfusion boundary region (PBR). The aim of this study was to test and validate this method.**

Materials and methods. **The study involved 38 healthy volunteers aged from 28 to 65 years (18 women and 20 men). The sidearm dark field microscopy of the mucosal microvessels in the sublingual area was used to determine the depth of penetration of red blood cells in endothelial glycocalyx to estimate PBR.**

Results end discussion. **The results indicate good tolerability of the test by patients. Our data on the structure of microvessels were highly reproducible and did not depend on the sampling region within sublingual area and on time intervals between sampling. PBR value was not gender-dependent.**

Conclusion. **The dark field microscopy method passed the first step of validation, showing a good feasibility and tolerability, as well as high reproducibility of measurements that are independent of the sampling region and time intervals between sampling.**

Keywords: *endothelial glycocalyx, dark field microscopy, cardiovascular disease, diagnostics.*

References

1. Gorshkov A. YU., Bojcov S. A.. EHndotelial'nyj glikokaliks – potencial'nyj sosudistyj biomarker: diagnosticheskaya i terapevticheskaya mishen' serdechno-sosudistyh zabolevanij// Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2015. T. 14. № 6. S. 87-92. [In Russian].

2. Amraoui F., OldeEngberink R.H., van Gorp J. et al. Microvascular glycocalyx dimension estimated by automated SDF imaging is not related to cardiovascular disease// Microcirculation. 2014. № 21(6). P 499-505.

3. Donati A., Damiani E., Luchetti M. et al. Microcirculatory effects of the transfusion of leukodepleted or non-leukodepleted red blood cells in patients with sepsis: a pilot study// Crit Care. 2014. № 18 (1). R33.

4. Groen B.B., Hamer H.M., Snijders T. et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes// J ApplPhysiol. 2014. № 116(8). P. 998-1005.

5. Lekakis J., Abraham P., Balbarini A. et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation // Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2011. № 18 (6). P. 775-789

6. Martens R.J., Vink H., van Oostenbrugge R.J. et al. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients// Cerebrovasc Dis. 2013. № 35(5). P. 451-454.

7. Mulders T.A., Nieuwdorp M., Stroes E.S. et al. Noninvasive assessment of microvascular dysfunction in families with premature coronary artery disease// Int J Cardiol. 2013. № 168(5). P. 5026-5028.

8. Vlahu C.A., Lemkes B.A., Struijk D.G. et al. Damage of the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients // J Am Soc Nephrol. 2012. № 23 (11). P. 1900-1908.