

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

НЕБЫЛИЦИН Ю.С., СУШКОВ С.А., СОЛОДКОВ А.П.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Резюме. Изучено изменение количества циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК), а также содержания продуктов деградации монооксида азота и содержания малонового диальдегида (МДА) в венозной крови в условиях перевязывания подвздошной вены у кролика и при введении в бедренную вену раствора тромбина (40 ЕД/кг). Количество ЦЭК определяли по методу Hladovec et al. (1978), концентрацию стабильных продуктов деградации монооксида азота (NO_2/NO_3) в плазме крови - по методу Грисса, содержание МДА - спектрофотометрически в бутаноловой фазе при длине волны 535 нм.

Также изучены морфологические изменения венозной стенки при моделировании острого венозного тромбоза. Материал для морфологического исследования изучали на 1 и 5 сутки. После приготовления препаратов производилось их исследование с помощью электронного микроскопа JEM 100B и JEM 100CX (Япония) с увеличением $\times 4800$ - 29000 .

В результате проведенного исследования установлено, что при острой венозной недостаточности в первые пять суток отмечалось увеличение числа ЦЭК на 58,27%, а после 15-х суток выявлялось снижение числа ЦЭК на 11,62% по сравнению с контролем. Содержание NO_2/NO_3 в плазме крови в первые пять суток оказалась выше на 41%, а на 15-е сутки на 8,3% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Содержание МДА через пять суток после перевязывания подвздошной вены было увеличено на 39,74% ($p < 0,05$), а на 15-е сутки статистически не отличалось от контрольных значений.

Отмечались структурные изменения эндотелиоцитов вены, которые имели определенную динамику. В первые сутки в клетках эндотелия наблюдались деструкция плазмолеммы и кариолеммы, а к 5-м суткам увеличивалась площадь десквамации эндотелия.

Следовательно, в первые пять суток острая венозная недостаточность сопровождается возрастанием числа ЦЭК, содержанием NO_2/NO_3 в плазме, МДА. После 15-х суток снижается число ЦЭК, содержание NO_2/NO_3 в плазме и МДА.

Таким образом, определение в крови ЦЭК, МДА и концентрации NO_2/NO_3 в плазме, может быть использовано как маркер, характеризующий выраженность острой венозной недостаточности.

Ключевые слова: дисфункция эндотелия, острая венозная недостаточность, острый венозный тромбоз.

Abstract. Changes of Circulating Endothelial Cells (CEC) amount and nitric monooxide destruction products and malonic dialdehyde (MDA) content in venous blood were studied in condition of rabbit iliac vein ligation with injection of thrombin

solution (40 IU) in femoral vein. CEC amount was estimated with Hladovec et al. (1978) method, nitric monooxide destruction products (NO_2/NO_3) concentration in the blood serum was assessed with the Griss technique, MDA content was assessed by using of spectrophotometry in butanolic phase with wave-length of 535 nm.

Morphologic changes of the venous wall were studied in the case of acute venous thrombosis modeling. Morphological study was conducted on the material taken at 1st and 5th days with electronic microscope JEM 100B and JEM 100CX (Japan) on 4800 – 29000 times magnification.

Results of the study revealed increasing of the CEC amount on 58,27% at first five days of acute venous insufficiency and decreasing of CEC amount after the 15th day on 11,62% comparing with control group. NO_2/NO_3 content in blood serum was found on 41% higher at the first five days and 8,3% ($p<0,05$) higher at the 15 day comparing with control group. MDA content at five days after iliac vein ligation was increased on 39,74% ($p<0,05$) and was statistically not different at the 15 day.

Structural changes of the vein endothelial cells were marked in its dynamic. At the 1st day destruction of plasmolemma and nuclear membrane was observed in endothelial cells whereas at five days endothelium desquamation area increase.

The first five days of acute venous insufficiency are accompanied with increasing of CEC amount, NO_2/NO_3 content in blood serum and MDA level. After the 15 days CEC amount, NO_2/NO_3 content in blood serum and MDA level decreased.

That's way defining CEC in the blood, MDA and NO_2/NO_3 concentration in the blood serum may be used as an acute venous insufficiency intensity marker.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210032, г. Витебск, ул. Чкалова 36-1-58. - Небылицин Ю.С.

В последние годы отмечается рост частоты случаев тромбоза глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей. Эпидемиологическое исследование проведенное, в Массачусетсе показало, что средняя частота новых случаев ТГВ в США составляет 48 на 100 000 населения в год [1, 3]. В Швеции ежегодно регистрируется 160 новых случаев ТГВ на 100 000 жителей [2].

Оперативные вмешательства в 25% случаев могут явиться причиной венозных тромбозов [3]. Наиболее высокий риск развития ТГВ отмечается при травмах и операциях на бедре, тазобедренном, коленном суставах и достигает 53%. При абдоминальных и торакальных хирургических вмешательствах венозный тромбоз возникает практически у каждого третьего пациента. При реконструктивных ангиохирургических операциях ТГВ встречается в 20-30% случаев [2, 3, 5]. Высокую опасность представляет ампутация и экзартикуляция нижних конечностей, при которых риск возникновения ТГВ достигает 60-70% [1, 2, 4].

В раннем послеоперационном периоде ТГВ может протекать бессимптомно. Клинические проявления появляются не сразу, а спустя

определенный промежуток времени, с нарастанием симптомов ТГВ. Поздняя диагностика ТГВ приводит к несвоевременному началу лечения, а также задержке мероприятий, направленных на профилактику тромбоэмболии легочной артерии [3, 6].

В возникновении ТГВ имеет значение: замедление тока крови, дисфункция эндотелия, повышение коагуляционного потенциала крови (триада Р.Вирхова) [1, 2]. При ТГВ нижних конечностей снижается объемная и линейная скорость венозного кровотока, а также увеличивается гидростатическое давление крови в венах. Постепенно нарастает гипоксия тканей стенок венозных сосудов, развивается тромбоз и воспаление. Ключевое значение в возникновении тромбоза и воспаления в этих условиях принадлежит дисфункции эндотелия вен [7, 8, 9, 10].

Оксид азота (NO) эндотелиального происхождения является мощным вазодилататором, ингибитором адгезии тромбоцитов и нейтрофилов к эндотелию. Он также способен связывать свободные радикалы кислорода. Одновременное увеличение продукции NO и супероксиданиона сопровождается возрастанием количества пероксинитрита - вещества, обладающего повреждающим действием. При повреждении кровеносных сосудов, в частности при венозном застое, может изменяться количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток и содержание продуктов деградации NO [11, 12].

В связи с этим представляется актуальным изучить характер дисфункции эндотелия при острой венозной недостаточности. Выявление характера дисфункции эндотелия позволят в перспективе разработать способы ранней диагностики ТГВ, усовершенствовать методы профилактики и лечения ТГВ, а также позволят разработать новые прогностические критерии течения заболевания.

Цель работы: изучить выраженность дисфункции эндотелия при экспериментальном моделировании острого нарушения венозного оттока и острого тромбоза глубоких вен системы нижней поллой вены

Методы

Эксперимент выполнен на 25 кроликах самцах и самках массой 3050-3450 г. (контрольная группа 13 здоровых кроликов) и 46 беспородных крысах самцах массой 300-350 г. (контрольная группа 16 здоровых крыс). После определения пульсации подвздошной артерии в месте её проекции производили разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 4-5см. Путём тупого разъединения мышц находили сосудисто-нервный пучок, выделяли в нём подвздошную вену и перевязывали её. Тромбоз в эксперименте воспроизводили путем введения 0,3 мл подогретого до 37-37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). Рану послойно ушивали. После выведения из наркоза экспериментальное животное помещалось в виварий, где проводилось наблюдение.

С помощью ультразвукового сканера "Logiq-500 Pro"(General Electric, США) с линейным датчиком 11 МГц в В-режиме и в режиме цветового доплеровского картирования определяли состояние между толщиной внутренней и средней стенкой перевязанной вены [13]. Для оценки состояния

кровотока использовали цветное доплеровское картирование через 1 час после операции, а также на 1, 3 и 5 сутки.

Кровь для исследования у экспериментальных животных получали из ушной и орбитальной вен на 1, 5, 15 и 30 сутки после операции. В качестве контроля исследовали кровь 13 здоровых кроликов и 16 здоровых беспородных крыс.

В венозной крови определяли содержание стабильных продуктов деградации NO (NO_2/NO_3), малонового диальдегида (МДА), а также число ЦЭК. Для определения количества ЦЭК использовали метод Hladovec et al. (1978) [14]. Он основан на изоляции клеток эндотелия из крови вместе с тромбоцитами, с последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата. Количество клеток подсчитывали в 100 мкл бедной тромбоцитами плазме в камере Горяева при световой микроскопии ($\times 200$) (рис.1).

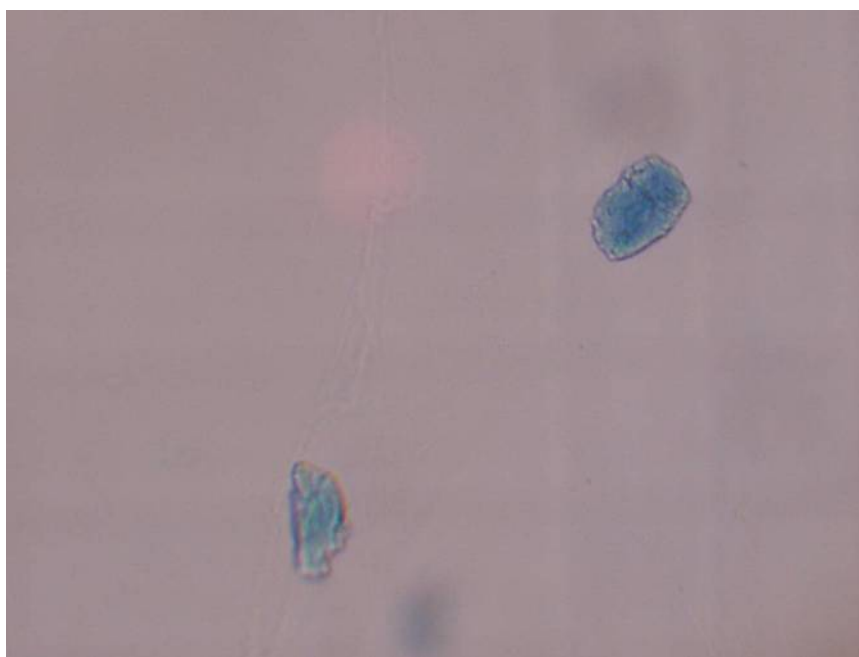


Рисунок 1 – Циркулирующая эндотелиальная клетка. Окраска 0,1% метиленовым синим ($\times 200$).

Содержание стабильных продуктов деградации монооксида азота в плазме крови определяли по методу Грисса. Конверсию нитратов в нитриты осуществляли цинковой пылью, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, которую добавляли в пробирку с исследуемой плазмой [15].

Содержание МДА определяли по методу В.Б. Гаврилова спектрофотометрически при длине волны 535 нм в бутаноловой фазе [16].

В течение исследования ни одно из опытных животных не погибло в результате проводимых экспериментаторами манипуляций.

Получение материала для морфологического исследования производили на 1 и 5 сутки. Морфологически оценивали состояние стенки интактной и тромбированной бедренной вены крысы.

Для проведения электронной микроскопии иссеченные участки тканей помещали в 4% раствор параформа, а затем фиксировали в 1%-ном растворе

четыреокси осмия (рН 7,4) на протяжении 2 часов при 4°C. После завершения осмиевой фиксации фрагменты вен обезвоживали в спиртах восходящей крепости, ацетоне и заливали в эпон-аралдитную смолу. Ультратонкие срезы получали с помощью ультратома фирмы LKB (Швеция), контрастировали в водном растворе уранилацетата и растворе цитрата свинца. Срезы изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM 100B и JEM 100CX (Япония).

Цифровой материал обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента и непараметрического критерия Mann-Whitney –Wilcoxon.

Результаты и их обсуждение

При ультразвуковом исследовании в норме до начала эксперимента в бедренной вене определялся кровоток, и выявлялась ее индуцированная пульсация, расположенной рядом бедренной артерии (рис.2).

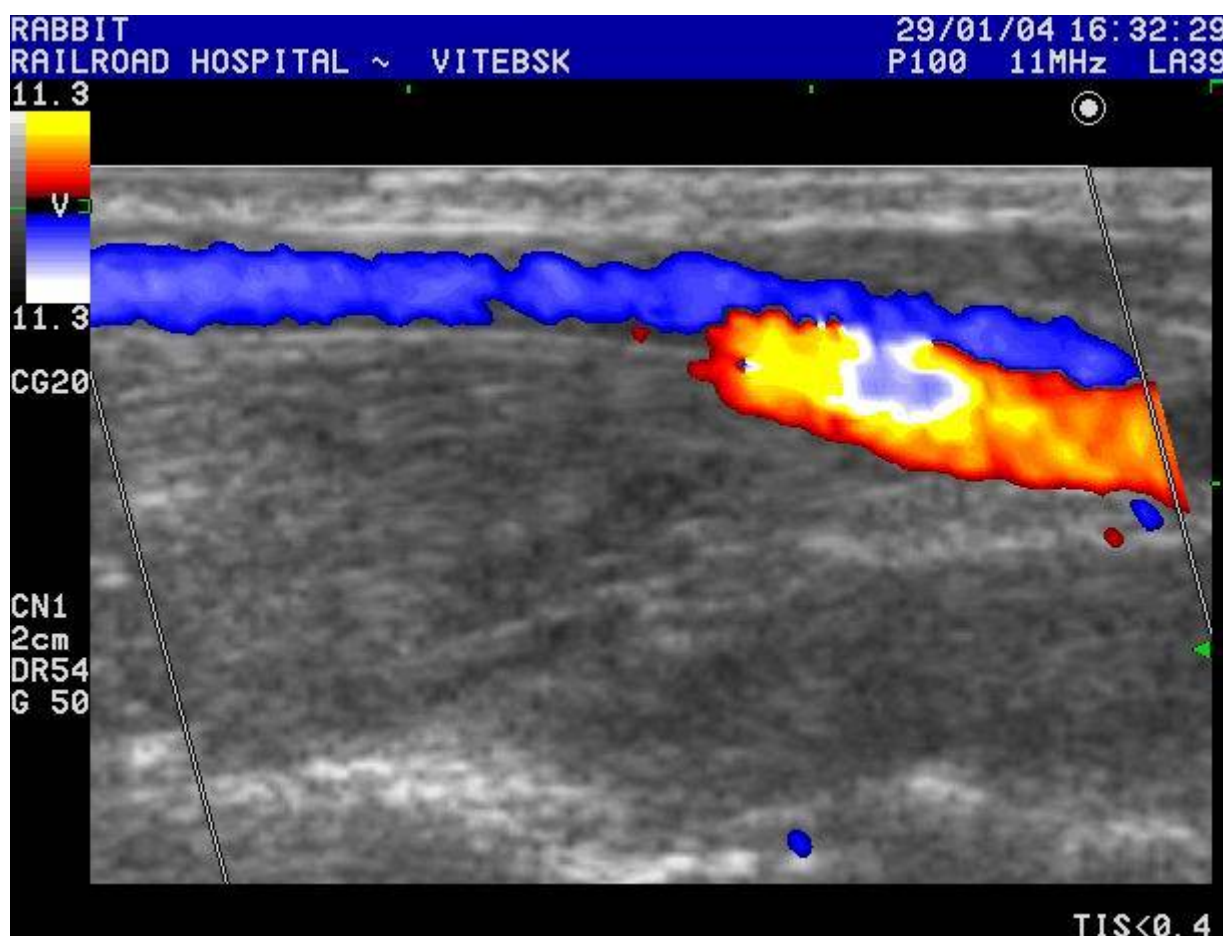


Рисунок 2 - Ангиосканограмма (режим ЦДК, продольная проекция) бедренной вены кролика в норме.

Через час после перевязки вены доплеровский сигнал над бедренной веной не регистрировался. В просвете определялись «дополнительные структуры», частично перекрывающие просвет вены. При цветовом доплеровском картировании и энергетическом доплере сигналы в просвете вены не регистрировались (рис.3). Толщина стенки бедренной вены составляла в среднем 0,8 мм, тогда как толщина внутренней и средней оболочки - 0,3 мм.

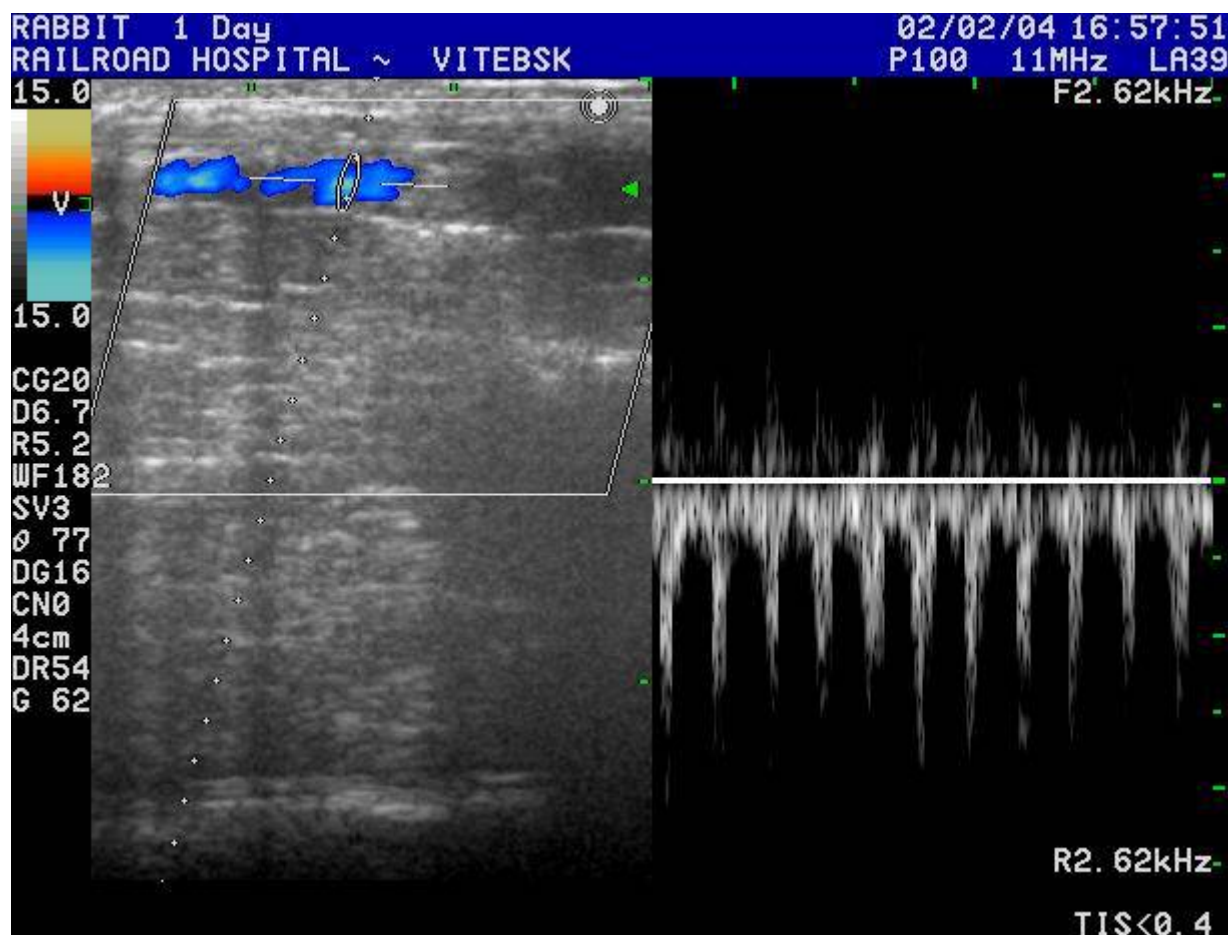


Рисунок 3 - Ангиосканограмма (режим ЦДК, продольная проекция) бедренной вены кролика через 1 час после перевязки вены

Через сутки после перевязки подвздошной вены у кроликов отмечалось увеличение размеров тромба в бедренной вене до 15,2 мм, а толщина интимы-медиа и всей стенки не изменилась. Скорость коллатерального кровотока вблизи бедренной вены в первые сутки увеличилась (рис.4).

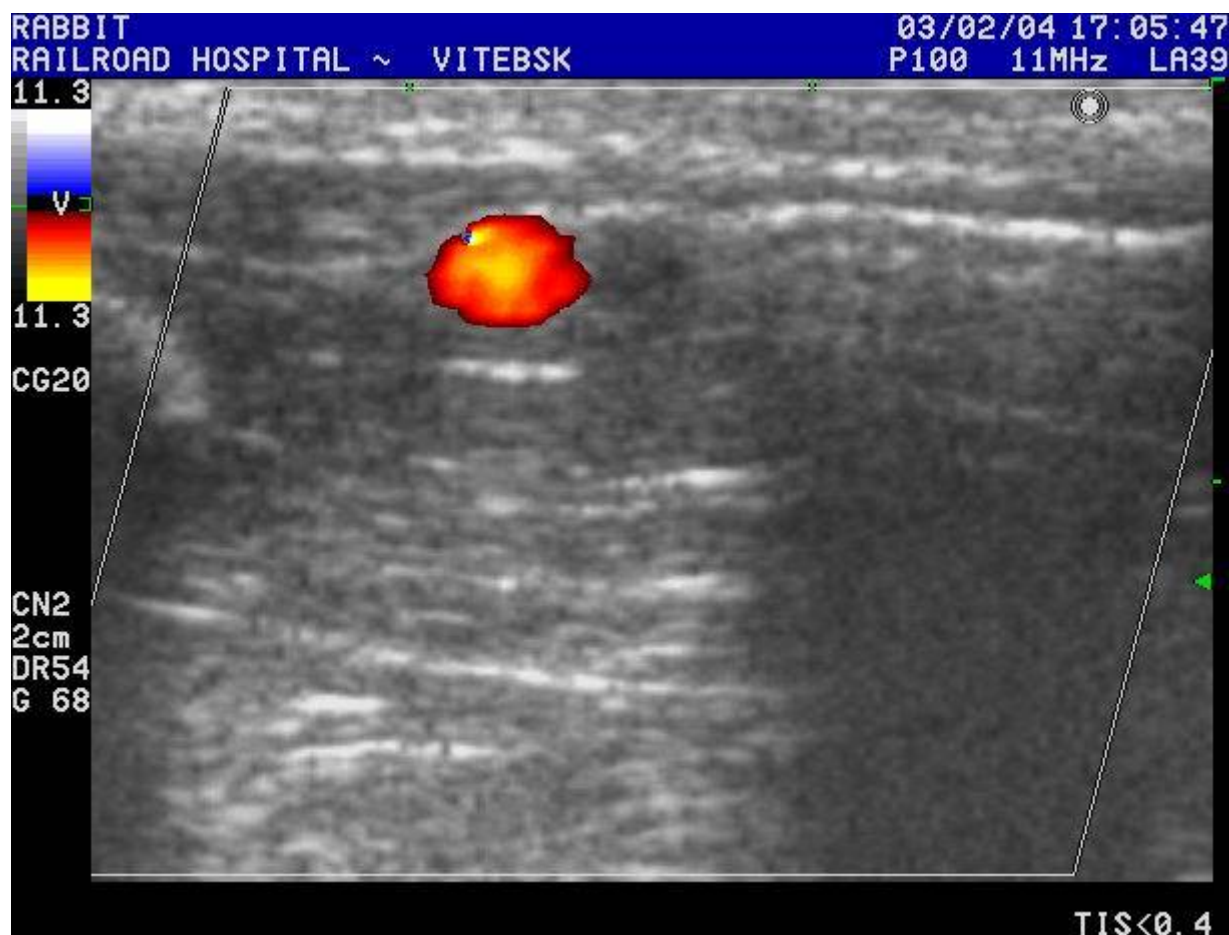


Рисунок 4 - Ангиосканограмма (режим ЦДК, продольная проекция) бедренной вены кролика через 1 сутки после перевязки вены

Через трое и пять суток отмечалось значительное развитие коллатерального кровотока. Толщина интимы-медиа и всей стенки бедренной вены не изменилось (рис.5).

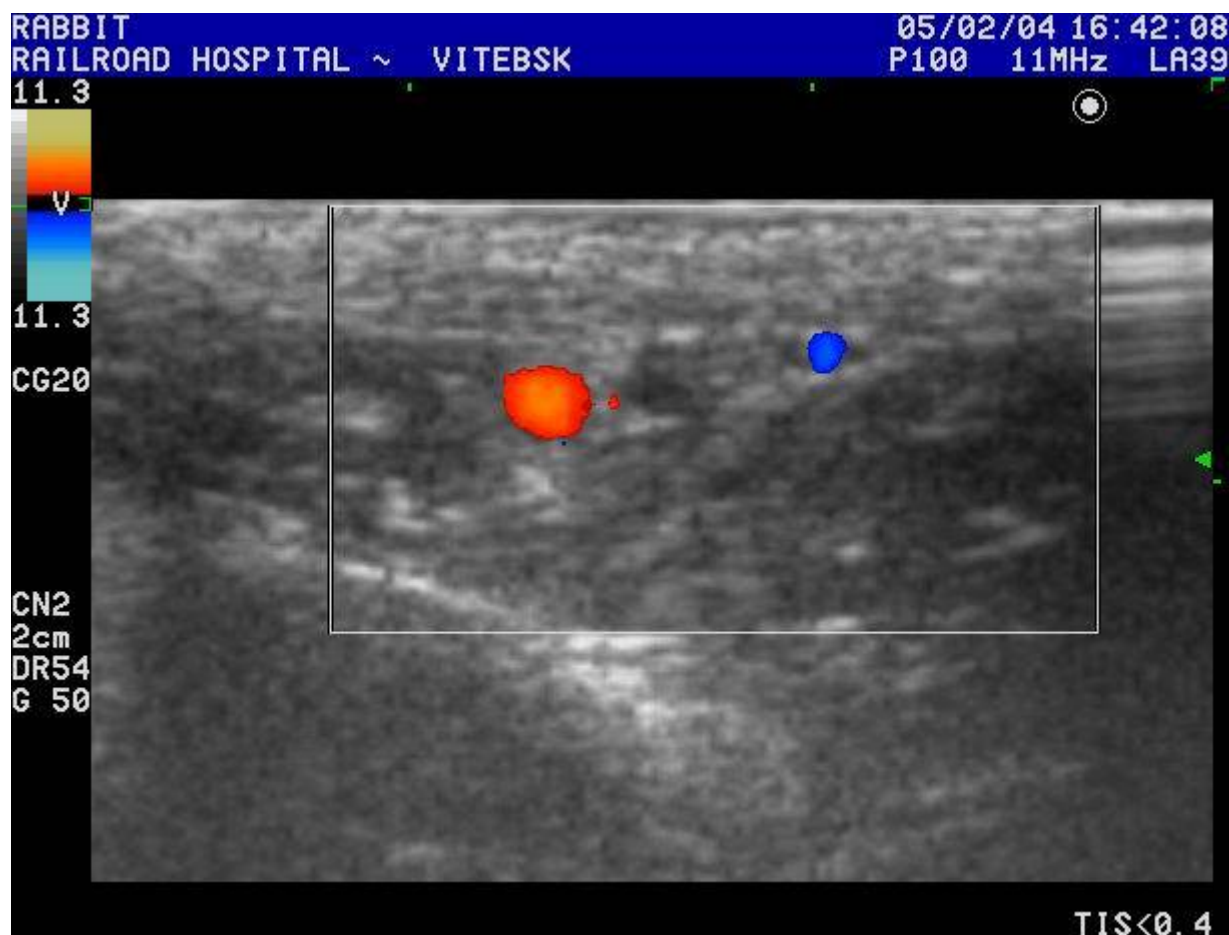


Рисунок 5 - Ангиосканограмма (режим ЦДК, продольная проекция) бедренной вены кролика через 5 суток после перевязки вены

Таким образом, при варианте моделирования острого нарушения венозного оттока путем перевязывания подвздошной вены уже в течение первого часа наблюдалось образование тромба в просвете вены. Поэтому данную модель можно использовать для изучения дисфункции эндотелия при остром тромбозе.

Динамика изменений количества циркулирующих эндотелиоцитов, содержание стабильных продуктов деградации NO и малонового диальдегида в крови при экспериментальном остром нарушении венозного оттока.

В венозной крови кроликов контрольной группы содержание NO₂/NO₃ было $34,35 \pm 2,96$ мкМ/л., количество ЦЭК оказалось равным $43,38 \pm 3,55$ клеток/100 мкл., концентрация МДА равнялась $68,76 \pm 8,64$ нМ/г (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в венозной крови
у экспериментальных животных при остром нарушении венозного оттока**

Показатели	1.Контрольная группа (n=13)	2.Опытная группа (5 суток) (n=23)	3.Опытная группа (15 суток) (n=17)
ЦЭК, кл/100мкл M±m	48,38 ± 3,55 ^{2,3}	76,65 ± 3,8 ^{1,3}	54,06 ± 1,19 ^{1,2}

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

Таблица 2

**Содержание малонового диальдегида и продуктов деградации монооксида азота
в венозной крови у экспериментальных животных при остром нарушении
венозного оттока**

Показатели	1.Контрольная группа (n=10)	2.Опытная группа (5 суток) (n=14)	3.Опытная группа (15 суток) (n=16)
Нитраты/нитриты. мкМ/л M±m	34,35 ± 2,96 ^{2,3}	48,44 ± 2,28 ^{1,3}	37,2 ± 1,68 ^{1,2}
МДА нМ/г M±m	68,76 ± 8,64 ^{2,3}	96,09 ± 8,62 ¹	79,32 ± 7 ¹

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

В первые пять суток количество ЦЭК оказалось увеличенным на 58,27% и составляло $76,65 \pm 3,8$ клеток/100 мкл. На 15 сутки количество ЦЭК возвращалось к значениям, обнаруженным в контрольной группе кроликов и составляло $54,06 \pm 1,19$ клеток/100 мкл.

В опытной группе в первые 5 суток содержание NO₂/NO₃ увеличивалось на 41% и составляло $48,44 \pm 2,28$ мкМ/л. Содержание МДА возросло на 39,74% и равнялось $96,09 \pm 8,62$ нМ/г. На 15 сутки после перевязки подвздошной вены у кроликов содержание NO₂/NO₃ и МДА возвращалось к таковому, обнаруженному в контрольной группе и составляло $37,2 \pm 1,68$ мкМ/л. и $79,32 \pm 7$ нМ/г, соответственно.

Таким образом, при остром нарушении венозного оттока наблюдается повышение количества циркулирующих в крови эндотелиоцитов, увеличение содержания NO₂/NO₃, МДА. Через 15 суток после перевязывания подвздошной вены отмечается снижение количества циркулирующих эндотелиоцитов, а

также уменьшение содержания продуктов деградации монооксида азота и МДА.

Динамика содержания циркулирующих эндотелиоцитов в крови при моделировании острого тромбоза бедренной вены путем введения тромбина

Количество ЦЭК в венозной крови крыс контрольной группы составило $27,42 \pm 1,33$ клеток/100 мкл (табл. 3).

Таблица 3

Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в венозной крови у экспериментальных животных при остром тромбозе бедренной вены

Показатель	1.Контроль ная группа (n=16)	2.Опытная группа (1 сутки) (n=28)	3.Опытная группа (5 суток) (n=30)	4.Опытная группа (15 суток) (n=28)	5.Опытная группа (30 суток) (n=23)
ЦЭК, кл/100мкл M±m	$29,94 \pm 1,37^{2,3,4,5}$	$38,96 \pm 1,53^{1,3,4,5}$	$33,13 \pm 1,16^{1,2,4,5}$	$25,96 \pm 1,31^{1,2,3,5}$	$18,43 \pm 0,43^{1,2,3,4}$

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

В первые сутки после введения тромбина наиболее значительное увеличение содержания ЦЭК определялось в первые сутки на 30,12% и составило $38,96 \pm 1,53$ клеток/100 мкл. Через 5 суток содержание ЦЭК было на 10,65% выше, чем в контроле, но ниже, чем в первые сутки после экспериментального моделирования тромбоза на 14,97% и равнялось $33,13 \pm 1,16$ клеток/100 мкл. На 15-е сутки количество ЦЭК возвращалось к значениям, обнаруженным в контрольной группе $25,96 \pm 1,31$ клеток/100 мкл. На 30-е сутки отмечалось снижение ЦЭК на 38,5% по сравнению с контролем и составляло $18,43 \pm 0,43$ клеток/100 мкл.

Таким образом, при экспериментальном моделировании острого тромбоза глубоких вен после введения тромбина наблюдалось повышение в крови циркулирующих эндотелиальных клеток.

Проведенные исследования показали, что при моделировании острой венозной недостаточности в эксперименте происходит отслоение клеток эндотелия от базальной мембраны, а также увеличивается образование монооксида азота и малонового диальдегида.

Электронно-микроскопическая характеристика эндотелия интактной бедренной вены крысы

При электронно-микроскопическом исследовании вен эндотелиальная стенка была сохранена на всем протяжении. Эндотелиоциты представляли собой одноядерные клетки. Их ядра находились в центральной части клетки, имели вытянутую форму с глыбчатым расположением хроматина и неглубокими инвагинациями ядерной оболочки (рис. 6).

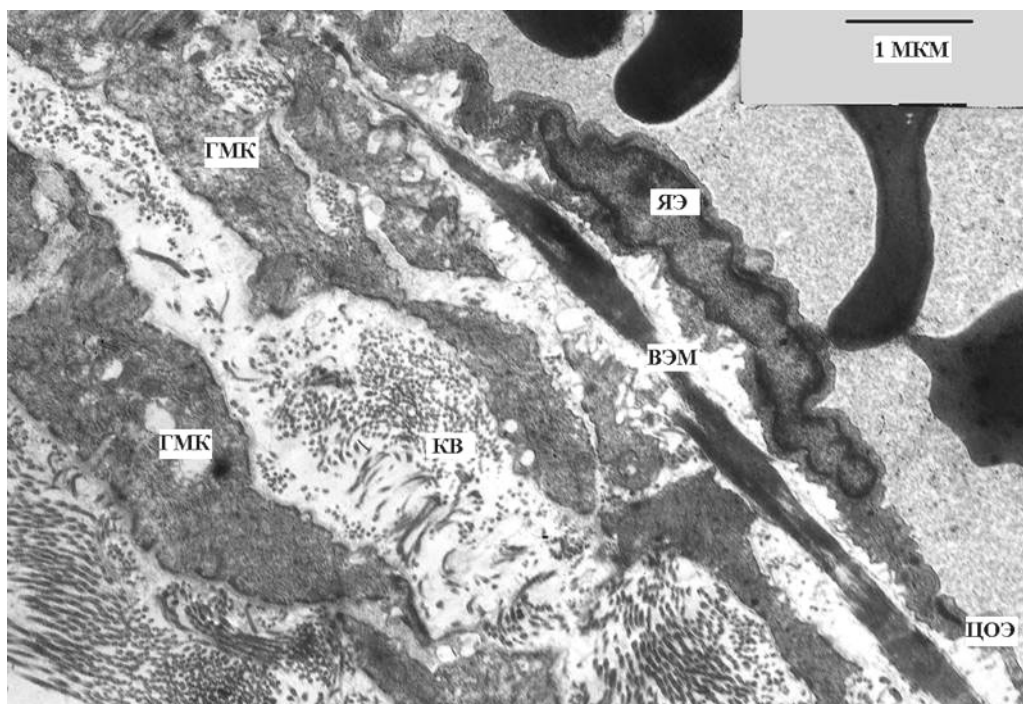


Рисунок 6. Ультраструктурная организация интактной вены. ЯЭ – ядро эндотелиоцита, ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана, ГМК – гладкомышечная клетка, ЦОЭ – цитоплазматический отросток эндотелиоцита, КВ – коллагеновые волокна.

В некоторых случаях встречались дву- и многоядерные клетки. В околоядерной и цитоплазматической зонах располагались митохондрии и комплекс Гольджи. В цитоплазме выявлялись единичные полирибосомы и микрофибриллы, которые часто контактировали с цитолеммой и ядерной оболочкой.

В периферической зоне эндотелиоцита, обращенного в просвет сосуда наблюдалось умеренное везикулообразование. Микропиноцитозные пузырьки сосредоточивались в цитоплазме свободно.

Вытянутая форма и небольшая толщина цитоплазматических отростков (ЦО) эндотелиоцитов создавали контраст с ядросодержащей частью клетки.

Иногда ЦО проникали в субэндотелиальный слой. Базальная поверхность эндотелиоцитов часто контактировала с гладкомышечной клеткой и коллагеновыми волокнами. В контактной зоне эндотелиоциты образовывали плотные контакты друг с другом. Толщина субэндотелиального слоя была неодинаковой в различных местах интимы.

Изменение структурной организации эндотелиоцитов бедренной вены крысы через 24 часа после моделирования экспериментального тромбоза

При помощи электронной микроскопии было установлено наличие эндотелия практически на всей внутренней оболочке вены, отмечалось небольшое набухание эндотелиоцитов. Эндотелиоциты имели вытянутую форму, наблюдалось истончение их клеточной мембраны и уменьшение объема цитоплазматической части.

Кроме этого в эндотелиоцитах выявлялись следующие изменения: увеличение электронной плотности цитозоля, увеличение образования цитоплазматических выростов, нарушение целостности цитоплазматической мембраны, изменение формы митохондрий. Ядра эндотелиоцитов имели продолговатую форму, кариолемма образовывала небольшие выпячивания, направленные вглубь субэндотелиального слоя. Отмечалось повышение электронной плотности внутренней эластической мембраны (рис. 7).

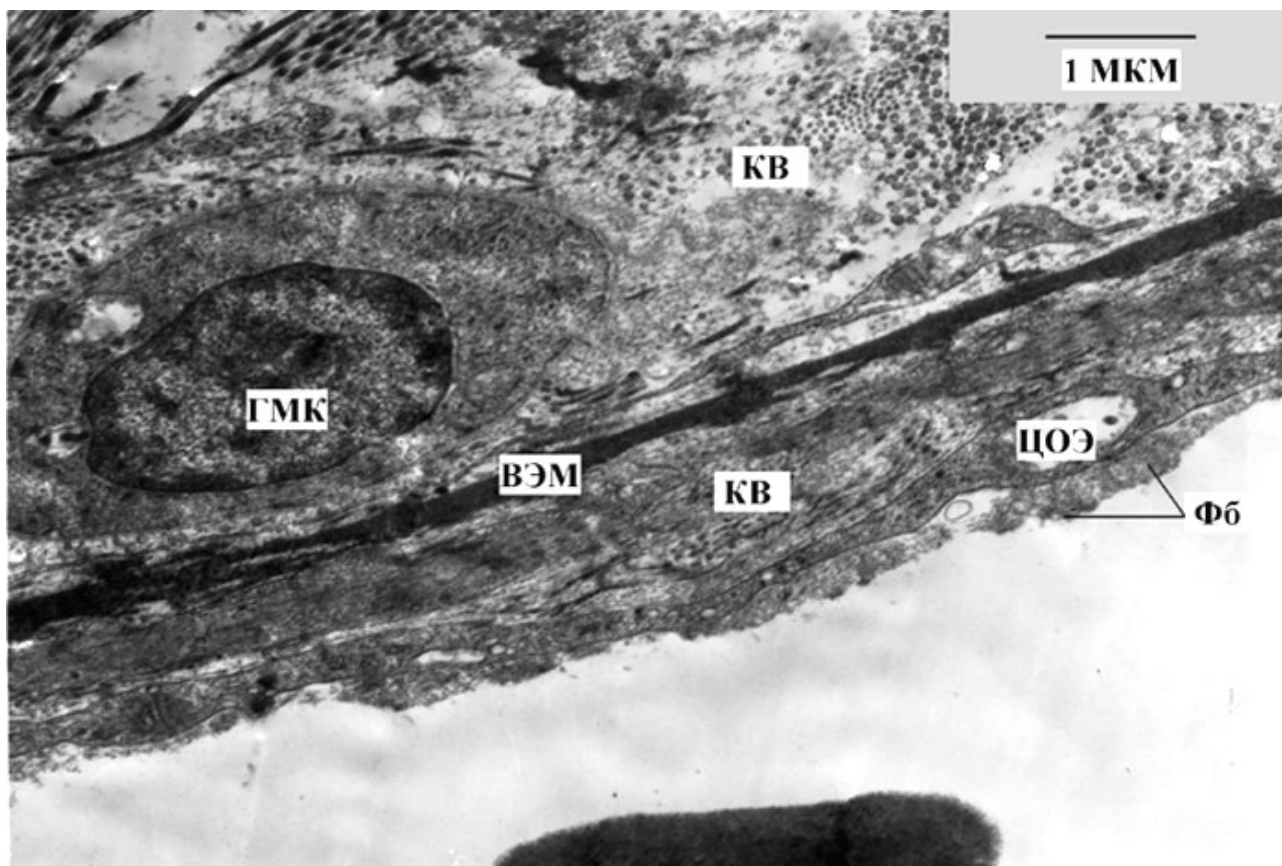


Рисунок 7. Ультраструктурная организация венозной стенки через 24 часа после экспериментального моделирования тромбоза. К интиме прилежат волокна фибрина. В эндотелии – мелкие везикулы.

Изменение структурной организации эндотелия бедренной вены крысы через 5 суток после моделирования экспериментального тромбоза

Эндотелий на большинстве участков вены отсутствовал. В тех местах, где эндотелий был сохранен, обнаруживалось изменение его формы, истончение и деформация. Наблюдались небольшие набухшие участки, содержащие множество мельчайших везикул, а также участки с крупными полостными образованиями. Также отмечалось очаговое нарушение целостности ядерной оболочки (рис. 8).

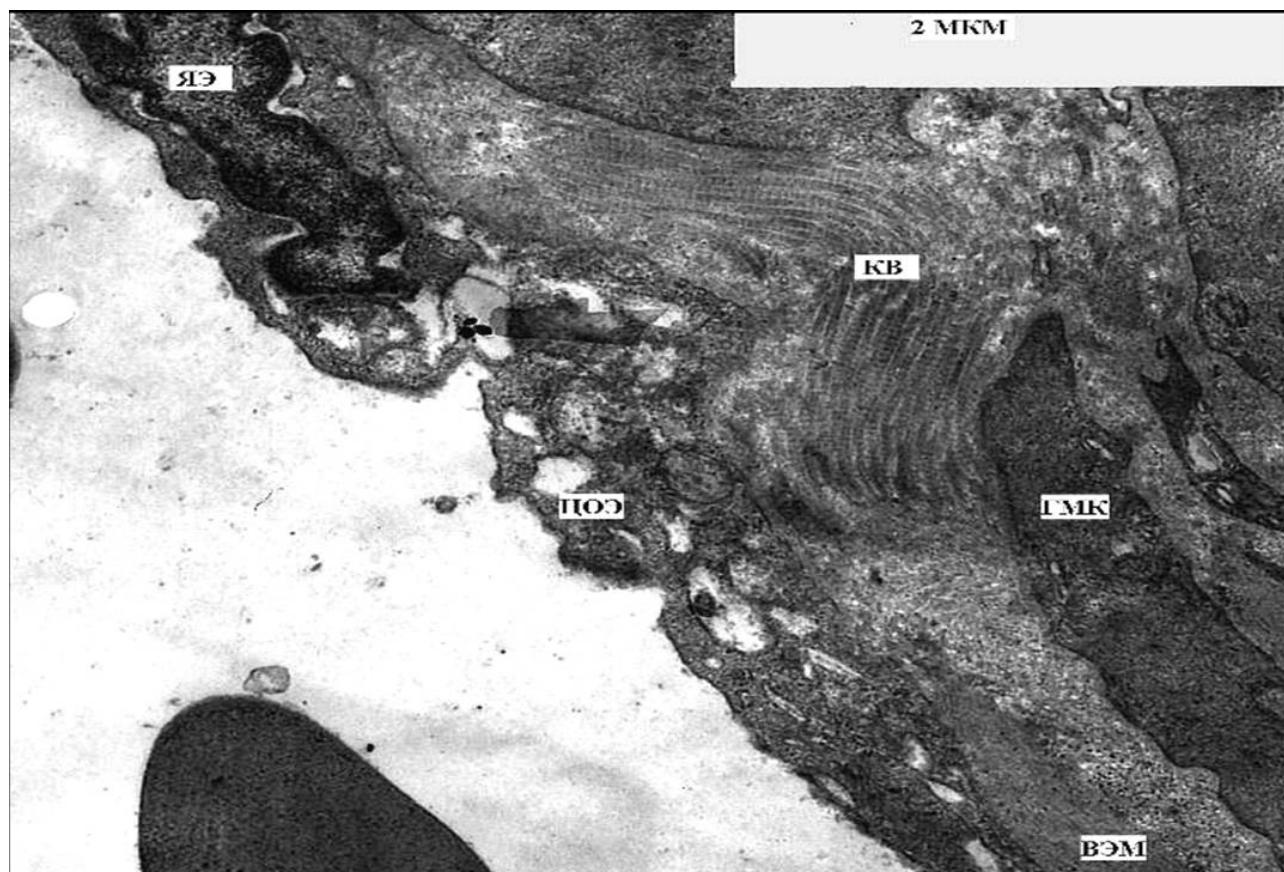


Рис. 8. Ультраструктурная организация венозной стенки через 5 суток тромбоза. В цитоплазме эндотелиальной клетки содержится множество везикул.

Таким образом, при экспериментальном моделировании острого венозного тромбоза наблюдаются ярко выраженные изменения динамики эндотелиоцитов вены. Клетки эндотелия подвергаются дистрофическим изменениям: в ранние сроки наблюдается деструкция плазмолеммы и кариолеммы, а к 5-м суткам увеличивается площадь десквамации эндотелия.

Выводы

1. Изменение функции эндотелия играет важную роль в развитии острого нарушения венозного оттока и острого тромбоза глубоких вен.

2. При экспериментальном моделировании острого нарушения венозного оттока и острого тромбоза глубоких вен выявляются ярко выраженные динамические изменения количества ЦЭК и содержания NO_2/NO_3 : в первые пять суток отмечается увеличение количества ЦЭК и содержания NO_2/NO_3 , с последующим их снижением к 15 суткам.

3. Отмечаются также динамические структурные изменения эндотелия вен при экспериментальном моделировании венозного тромбоза.

4. Определение концентрации продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида, числа циркулирующих эндотелиоцитов может служить дополнительным диагностическим критерием для оценки тяжести

патологического процесса при остром нарушении венозного оттока и остром тромбозе глубоких вен.

Литература

1. Баешко, А. А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбоэмболия легочной артерии. / А.А. Баешко. - М., 2000.- 136 с.
2. Профилактика и лечение тромбоза глубоких вен: учеб.- метод. пособие : / авт.— сост. М.Т. Воевода, А.А. Баешко – Минск : Белпринт, 2006. – 48 с.
3. Флебология: Руководство для врачей / Савельев В.С., [и др.]; под ред. В.С.Савельева. - М.: Медицина, 2001.-664 с.
4. Суджаева, С.Г. Тромбоэмболия легочной артерии. / С.Г. Суджаева. – Минск: Белпринт, 2004. – 128 с.
5. Stein, P.D. Acute pulmonary embolism / P.D. Stein // Dis. Mon. – 1994. – Vol. 40. – P. 467-523.
6. Константинова, Г.Д. Флебология. / А.Р. Зубарев, Е.Г. Градусов. - М.: Издательский дом Видар, - 2000.-160 с.
7. Zanetti, M. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells / M. Zanetti, Z.S. Katusic, T. O'Brien // J.Vase. Res.- 2000.-Vol.37, № 6.- P. 449-456.
8. Michiels, C. Interactions between endothelial cells and smooth muscle cells after their activation by hypoxia. A possible etiology for venous disease / C. Michiels, T. Arnould, D. Janssens // Int. Angiol. - 1996.- Vol. 15, № 2. - P. 124-130.
9. Michiels, C. Endothelial cell reponses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions / C. Michiels, T. Arnould, J. Remabe // J. Biophys. Biophys. Acta.- 2000.- Vol. 1497, № 1.- P. 1-10.
10. Баркаган, З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза. / З.С. Баркаган, А.П. Момот. - Москва, 1999.-246 с.
11. Количество циркулирующих эндотелиоцитов и базальный уровень NO кровеносных сосудов у пациентов с хронической венозной недостаточностью / А.Н.Косинец [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. II-ой международной научно-практической конференции / Витебск.гос.мед.ун-т.- Витебск, 2002 г.- С.175-179.
12. Концентрация стабильных продуктов деградации NO и число циркулирующих эндотелиоцитов как дополнительный диагностический критерий для оценки тяжести венозной патологии. / С.А.Сушков [и др.] // Дисфункция эндотелия: сб. тр. 3-ой международной научно-практической конференции / Витебск.гос.мед.ун-т.- Витебск, 2004.-С. 247-251.
13. Зубарев, А.Р. ультразвуковая диагностика заболеваний вен нижних конечностей / А.Р.Зубарев, В.Ю.Богачев, В.В.Митьков. – Москва: Видар, 1999.- 104с.
14. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions / J. Hladovec // Physiologia bohemoslovaca. – 1978. - Vol.27.- P.400.

15. Модифицированный метод определения NO₃ и NO₂ с помощью цинковой пыли в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И.С.Веремей [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. республиканской научно-практической конференции / Витебск.гос.мед.ун-т. – Витебск, 2000.-С.112-115.

16. Гаврилов, В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1998. - №2. – С.60-64.