

УДК: 611 – 018.74.001.6

## НЕКОТОРЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Н.Е. МАКСИМОВИЧ<sup>1</sup>, В.И. КОЗЛОВСКИЙ<sup>2</sup>, Н.А. МАКСИМОВИЧ<sup>3</sup>

Кафедра патофизиологии<sup>1</sup>, фармакологии<sup>2</sup>, педиатрии №2<sup>3</sup> ГГМУ

*В статье дана характеристика современных методов изучения морфо-функциональных свойств эндотелия сосудов в эксперименте. Наиболее подробно описаны модели изучения эндотелий-зависимых и эндотелий-независимых вазоактивных свойств изолированных сосудов с помощью изометрического, изобарического методов, метода «изолированного сердца» по Лангендорфу, а также метода подсчета количества циркулирующих эндотелиальных клеток.*

**Ключевые слова:** методы исследования, дисфункция эндотелия.

*Modern methods of study of morphofunctional properties of vascular endothelium in experiments are characterized. Models of assessment of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular responses in isolated vessels by isometric and isobaric methods, isolated heart method by Langendorff as well as counting of circulated endothelial cells are described in detail.*

**Key words:** methods, dysfunction of endothelium.

Вновь обнаруженные морфо-функциональные свойства эндотелия существенно изменили представления ученых о повреждении эндотелиальных клеток как об их простом лизисе. Стало очевидным, что начальными проявлениями их повреждения являются функциональные изменения синтеза и деградации в эндотелии различных биологически активных веществ. Одной из наиболее значимых и важных функций эндотелия является обеспечение адекватной перфузии тканей [5, 11]. Установлено, что в эндотелии образуются основные вазодилататоры, такие, как оксид азота, простагландины и эндотелиальный гиперполяризующий фактор, а также группа эндотелинов с вазоконстрикторными свойствами. Кроме того, эндотелий осуществляет захват и деградацию многих вазоактивных веществ, таких, как катехоламины, брадикинин, серотонин, ангиотезин I и др. [5].

В связи с этим в современной научной и клинической литературе в формировании атеросклероза и других заболеваний сосудов активно дискутируется роль NO-зависимой дисфункции эндотелия (ДЭ) [3, 4, 5, 6, 17, 28]. Образуясь в эндотелии, а также в тромбоцитах, адвентиции, лейкоцитах, лейкоцитах и других клетках организма, оксид азота (NO) выполняет роль универсального регулятора гомеостаза [23, 24]. Участвуя в реализации сосудодвигательных, антитромбогенных, иммунных, анти- и прооксидантных, метаболических, транспортных и других реакций организма, он обеспечивает интегративное взаимодействие всех систем организма и их устойчивое функционирование при воздействии агрессивных факторов внешней среды.

Как отмечалось выше, нарушение нормального функционирования эндотелиальных клеток является началом развития атеросклероза и других патологических состояний. К формированию ДЭ приводят курение, гиперхолестеринемия, гиподина-

мия, стрессы, гомоцистеинемия и другие факторы [5, 12, 17]. При повреждении сосудистого эндотелия происходит нарушение баланса сосудорасширяющих и сосудосуживающих эффектов, как правило, в сторону преобладания вазоконстрикции, что приводит к возникновению сосудистой гипертензии.

Однако многие механизмы развития ДЭ еще не изучены. В значительной степени это связано с несовершенством и сложностью методических подходов, используемых в экспериментальной и, особенно, в клинической работе [1, 3].

*Структурные признаки повреждения эндотелиальных клеток на современном этапе исследуют методом сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии (количественный и качественный иммуноцитохимический анализ и др.), методом световой микроскопии с определением в единице объема крови циркулирующих эндотелиальных клеток и методом радиоавтографии, основанном на увеличении поглощения эндотелием при его повреждении меченных изотопами веществ [2, 20, 25].*

Для решения ряда научных и прикладных задач используются биохимические методы выявления повреждения эндотелия *in vitro*, основанные на регистрации изменений его метаболических функций (по выделению в среду ранее поглощенного <sup>51</sup>Cr, лактадегидрогеназы, по повышению образования простагландинов, изменению митохондриальной функции – степени окисления сукцината и др.) [5, 6]. В последнее время обнаружено, что в ответ на различные повреждающие стимулы – воздействие эндотоксина, тепловой шок, вирусную инфекцию и др. – в эндотелиальных клетках увеличивается экспрессия белков «стресса», не свойственных для них в норме: тканевого фактора (гликопротеида каскада свертывания крови), интерферонов; повышается концентрация ангиотензин-конвертирующе-

го фермента, интерлейкина-1, тромбоцитарного фактора роста, сосудистого эндотелиального фактора роста, межклеточных адгезивных молекул, сосудистых клеточных адгезивных молекул [15, 18, 21, 22]. Эти белки могут служить специфическими маркерами повреждения эндотелиальных клеток.

*Барьерную функцию* эндотелия оценивают по скорости прохождения сквозь него липопротеидов низкой плотности и низкомолекулярных соединений, альбумина и макромолекул, меченных изотопами, пероксидазой хрена, электронно-плотными веществами и красителями [5].

*Адгезивные свойства* эндотелия оценивают по взаимодействию с его стенкой меченных изотопами клеток крови:  $^{51}\text{Cr}$  - лейкоцитов,  $^{111}\text{In}$  - тромбоцитов,  $^{59}\text{Fe}$  - эритроцитов [5].

В последнее время в экспериментальной и клинической практике широко используются *функциональные методы, регистрирующие нарушения сосудодвигательных свойств эндотелия* [1, 19, 27]. В настоящей работе мы остановимся преимущественно на последней группе функциональных методов, которые получили наибольшее распространение в решении задач фундаментального и прикладного характера.

#### **Общие принципы, лежащие в основе методов оценки NO-зависимых сосудодвигательных свойств эндотелия сосудов**

Для оценки сосудодвигательных свойств эндотелия *in vivo* и *in vitro* используют ряд специфических стимуляторов либо ингибиторов синтеза вазоактивных веществ, вырабатываемых в эндотелиальных клетках. По степени дилатации или констрикции сосудов после воздействия данных веществ на эндотелий сосудов судят о его функциональной активности.

Благодаря успехам в разработке доноров оксида азота (L-аргинин, нитропруссид натрия, Glyceroltrinitrate, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, 3-Morpho-lynosydnonimine, S-Nitrosoglutathione и др.), стимуляторов NO-синтаз (NOS) - (Acetylcholine, Bradykinine, Histamine, L-Glutamic Acid, ADP и др.) и неселективных ингибиторов NOS (N $\omega$ -Nitro-L-Arginine Methyl Ester, N $\omega$ -Nitro-L-Arginine), а также селективных ингибиторов NOS (нейрональной NOS - 7-Nitro-Indazole, Spermidine и индуцибельной NOS - S-Methylisothiourea, L-N $^6$ -(1-Iminoethyl) lysine др.) данный методический подход начал широко использоваться в экспериментальной и клинической медицине для диагностики и уточнения механизмов NO-зависимой ДЭ при различных патологических состояниях.

Для оценки характера функциональных изменений эндотелия используют вещества, способные стимулировать процесс выработки оксида азота эндотелием сосудов (ацетилхолин и др.) и осуществлять зависимую от эндотелия вазодилатацию [19]. Независимую от эндотелия вазодилатацию изучают с помощью веществ – доноров оксида азота, как непосредственных активаторов гуани-

латциклазного миогенного механизма вазорелаксации гладких мышц сосудов.

#### **Диагностика дисфункции эндотелия *in vitro* с использованием изолированных сосудов изометрическим методом**

Метод основан на определении изменений изометрического напряжения колец артерий магистрального типа, помещенных в водяную баню типа «organ bath» [24, 29]. Метод является одним из современных подходов в изучении функциональной активности эндотелия в осуществлении вазоактивных реакций сосудов. При помощи этой методики в условиях эксперимента можно не только оценить состояние эндотелия, но и уточнить причины его повреждения, разработать методы коррекции, сравнить их эффективность.

*Реализация метода.* Для исследований используются кольцевидные сегменты сосудов (аорты крыс или других мелких лабораторных животных) толщиной 2-3 мм, выделенных в условиях тиопенталового наркоза (внутривенно, 60 мг/кг). Данную методику можно также выполнять на регионарных сосудах крупных животных.

Для исследований кольца аорты помещают в водяную баню типа «organ bath», представляющую двухстенный стеклянный сосуд (рис. 1). Внутренний цилиндр сосуда заполняют буферным раствором Кребса. Исследуемые кольцевидные сегменты сосудов подвешивают между стальными проволочными держателями. Один держатель укрепляют на дне сосуда, а другой прикрепляют к специальному датчику, соединенному с устройством, регистрирующим величину изометрического напряжения сосудистых колец. В раствор Кребса производится непрерывная подача кислорода, а во внешнем цилиндре водяной бани обеспечивается постоянная циркуляция воды и с помощью водяного термостата поддерживается постоянная температура (37°C). Исследуемые кольца сосудов выдерживают при изометрическом натяжении в один грамм в течение 1 часа для развития в них стабильного напряжения. Для достижения тонического сокращения сосуда в водяную баню с подвешенным сегментом исследуемого сосуда вносят хлорид калия в возрастающих концентрациях (30, 60, 90, 120 mM) до воспроизведения зависимой от концентрации раствора вазоконстрикторной реакции. На следующем этапе в сосудистых кольцах вызывают максимальную вазоконстрикторную реакцию с помощью норэпинефрина или фенилэфрина ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$  M). Изучение вазодилаторной активности эндотелия производится на сосудистых кольцах, спазмированных фенилэфрином или норэпинефрином ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) до уровня 70% от максимальной вазоконстрикции. С целью исследования обусловленной эндотелием NO-зависимой дилатации на кольца сосудов воздействуют сосудорасширяющими субстанциями, стимулирующими синтез NO в эндотелии (ацетилхолин, брадикинин, АДФ и др.). Для построения дозозависимой кривой ацетилхолин последовательно вносят в водяную баню со ступен-

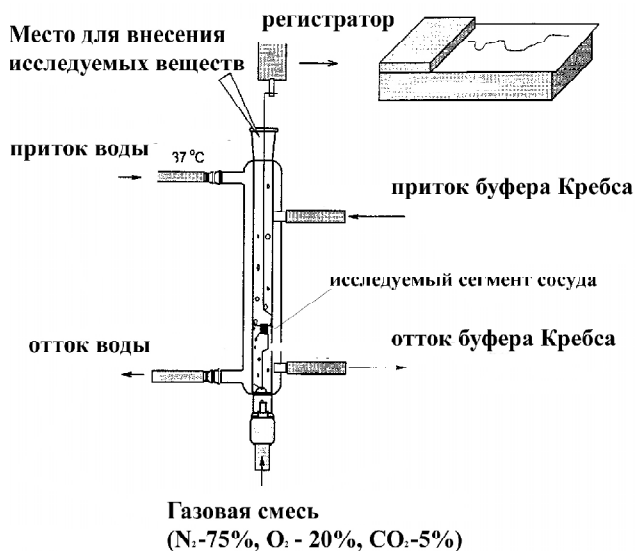


Рис. 1. Схема устройства для исследования вазоактивных реакций эндотелия сосудов *in vitro* методом изометрии.

чатый возрастанием концентрации от  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  М. В случае отсутствия необходимости в построении такой кривой изучают максимальный дилатационный ответ колец на концентрацию ацетилхолина  $10^{-5}$  М. В аорте, лишенной эндотелия, ответ на ацетилхолин не происходит, он также полностью ингибируется неселективными ингибиторами NOS (L-NAME –  $10^{-4}$  М и др.) [8]. Сосудорасширяющие ответы, независимые от эндотелия, оценивают путем использования эндотелий-независимых вазодилаторов (см. выше).

Регистрацию сосудистых ответов на вносимые субстанции осуществляют на миллиметровой бумаге с помощью регистрирующего устройства. Величину вазодилатации колец сосудов под влиянием определенных субстанций выражают в процентах от величины вазоконстрикторного ответа, на фоне которого регистрируется сосудорасширяющий эффект.

Изучение сосудорасширяющих ответов на ацетилхолин позволяет оценить функциональную активность эндотелия сосудов, в частности, его NO-продуцирующую способность, в то время как изучение вазоактивных реакций прямых миогенных вазодилаторов позволяет оценивать состояние эндотелий-независимых гуанилатциклазных механизмов миогенной вазодилатации.

С целью скрининговой количественной оценки степени повреждения эндотелия сосудов в экспериментальной и клинической практике может быть применен более простой и быстрый метод количественной оценки вазоактивных свойств эндотелия и диагностики его дисфункции. Приготовленные в условиях термостатирования кольцевидные сегменты сосудов толщиной 2-3 мм помещают под окуляр светового микроскопа с микрометром на предметное стекло в насыщенный кислородом раствором Кребса ( $37^{\circ}\text{C}$ ). После предварительного определения внутреннего диаметра кольца аорты в раствор Кребса вносится раствор норадренали-

на в конечной концентрации  $10^{-6}$  М. После максимальной вазоконстрикции и измерения его диаметра на кольцо аорты воздействуют раствором ацетилхолина ( $10^{-5}$  М) и регистрируют диаметр кольца аорты на фоне его максимального расслабления. Степень дилатации колец аорты под влиянием ацетилхолина выражается в процентах и характеризует состояние эндотелия и, прежде всего, его NO-зависимых механизмов вазодилатации.

#### Диагностика дисфункции эндотелия *in vitro* с использованием изолированных сосудов изобарическим методом

Метод с использованием изобарического миографа является одним из современных методов исследования сосудодвигательных эффектов эндотелия сосудов, позволяющих решать задачи аналогичные методу изометрии. Метод используется для исследования сосудов более мелкого калибра (100-1000 мкм) [7, 14]. Методика с использованием миографа методически более трудоемкая и дорогостоящая, чем изометрический метод. В отличие от предыдущей классической методики в миографе сосуд не растягивается между держателями, а фиксируется между двумя стеклянными канюлями с диаметром верхушки около 120 мкм, в результате чего сосуд находится в более физиологических условиях. В миографе сосуд заполняется и перфузируется раствором Кребса и подвергается воздействию трансмурального давления, приближающегося к имеющемуся *in vivo*. Благодаря этому сосуды могут развивать собственное миогенное напряжение, не наблюдающееся в кольцах сосудов, растянутых между держателями. Миограф позволяет перфузировать изучаемые сосуды растворами с различными субстанциями либо со стороны его просвета, либо со стороны гладкой мускулатуры, что создает новые перспективы исследования функций сосудов (рис. 2).

**Реализация метода.** Для канюлирования выделяют сегмент изучаемого сосуда длиной 2-3 мм. После этого камеру миографа заполняют раствором Кребса, а перфузируемую систему заполняют альбумином. Конец сегмента сосуда надевают на верхушку канюли и осторожно, но крепко фиксируют с помощью нейлоновой хирургической нити. После этого нагнетающее давление в приборе повышают до 20 мм. рт. ст. с целью вымывания крови из сосуда. Свободный конец сосуда надевают на вторую канюлю, положение которой может регулироваться. После канюлирования сегмент сосуда с камерой миографа помещают под микроскоп. Давление внутри сосуда ступенчато повышают до 100 мм. рт. ст. Исследуемый сегмент сосуда, находящийся под давлением, изучают с целью выявления на предмет просачивания альбумина в результате повреждения его стенки, что определяется по появлению альбумина в камере миографа.

После этого для стабилизации сосудистого тонуса сосуд выдерживают под давлением 100 мм рт. ст. в течение 45 минут. В течение этого време-

ни создают небольшой градиент давления (1-2 мм. рт. ст.), который обуславливается потоком 20 мкл/мин. Диаметр сосуда исследуют под микроскопом (увеличение 100x) и измеряют видеомикроскопической приставкой с последующей компьютерной обработкой результатов (компьютерная программа Vessel View, H.Nilson, JP Trading, Dania). Сигнал видеокамеры, вмонтированной в микроскоп, посылается на компьютер, который на основе затененности контура обчисляет диаметр сосуда. Значения диаметра сосуда регистрируют с помощью компьютера и линейного регистратора. Камера мюографа электрически термостатируется (37°C). Эксперименты выполняются с равными вносящим и выносящим давлениями. Используемые субстанции вводятся внесосудисто в камеру мюографа либо в перфузируемый сосуд с раствором Кребса.

После 45 минутной стабилизации сосуд сокращают норадреналином либо фенилэфрином ( $10^{-6}$  М). После этого изучают вазодилаторные ответы сосуда на ацетилхолин ( $10^{-10}$ -  $10^{-6}$  М), который добавляют непосредственно в кювету мюографа либо в перфузируемый сосудистый сегмент. В качестве эндотелий-независимых вазодилаторов используют доноры NO. Оценка сосудистых ответов на применяемые субстанции осуществляется аналогично методу изометрии.

#### Исследование эндотелий-зависимых вазоактивных эффектов коронарных сосудов изолированного сердца (метод Лангендорфа)

Метод изолированного сердца по Лангендорфу является одной из удобных моделей изучения сосудистых реакций в коронарном русле [10, 13, 26]. Наряду с методиками, выполняемыми на изолированных сосудах, он позволяет решать многие задачи фундаментальной и практической медицины. Наиболее часто методика с использованием изолированного сердца выполняется на мелких лабораторных животных – крысах, морских свинках, мышках.

Метод Лангендорфа предполагает канюлирование аорты. Другой конец канюли прикрепляется к резервуару, содержащему оксигенируемый перфузионный раствор Кребса. Перфузирование сердца раствором Кребса осуществляется ретроградно через аорту, коронарные сосуды, правое предсердие и правый желудочек и завершается через устье лёгочной артерии. Количество жидкости, протекающей через сердце в единицу времени, т. е. величина коронарного потока, зависит от тонуса коронарных сосудов. Величину коронарного потока регистрируют с помощью специального ультразвукового датчика. Увеличение коронарного потока свидетельствует о расширении коронарных сосудов и наоборот. Для оценки вазоактивных реакций коронарного русла эксперименты проводят в условиях постоянного давления. Перфузирование сердца крысы или морской свинки осуществляют под давлением 60 мм рт. ст., перфузирование сер-

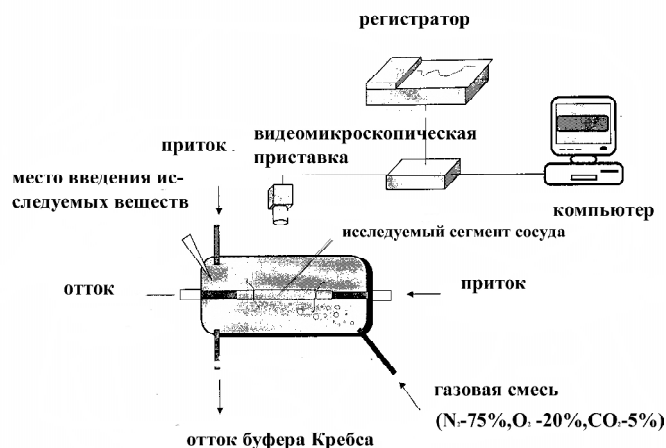


Рис. 2. Схема устройства для исследования вазоактивных реакций эндотелия сосудов in vitro методом изометрии.

дца мыши – под давлением 100 мм. рт. ст. Перфузионный раствор Кребса оксигенируют карбогеном (95%  $\text{CO}_2$  + 5%  $\text{O}_2$ ) и термостатируют до уровня 37°C.

**Реализация метода.** Извлечение сердца у животных производят в условиях тиопенталового или пентобарбиталового наркоза и введения гепарина для профилактики внутрисердечного тромбоза. Извлеченное из грудной клетки сердце изолируют, промывают холодным физиологическим раствором (4°C). После фиксации аорты на канюле начинают перфузию сердца. Длительность промежутка времени от момента изоляции сердца до начала перфузии должна быть не более 30 сек. Для оценки сократительной функции сердца в ходе эксперимента в левый желудочек через отверстие в левом предсердии вводится силиконовый или латексный баллончик, наполненный жидкостью и соединённый с датчиком давления. Он позволяет регистрировать давление и скорость его изменения ( $dP/dt$ ) в левом желудочке сердца. Сократительная функция миокарда оценивается по уровню давления в левом желудочке. При изучении вазоактивных реакций проводят постоянную электрическую стимуляцию сердца с помощью введенных в правое предсердие двух платиновых электродов. После стабилизации коронарного кровотока и сократимости сердца исследуют эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые вазоактивные реакции с использованием фармакологических веществ эндотелиотропного и прямого миотропного действия, информация о которых изложена выше. Исследуемые вещества вводятся в систему проксимальнее канюли в виде 1-2-х минутной инфузии. Оценку сосудистых эффектов осуществляют по степени убыли или прироста величины коронарного потока. В связи с быстротой выполнения метод изолированного сердца очень удобен не только для оценки функции эндотелия коронарных сосудов, но и для скрининга веществ, обладающих

эндотелий-зависимым сосудорасширяющим действием.

### Определение количества циркулирующих эндотелиоцитов в периферической крови

Повышение количества циркулирующих эндотелиальных клеток наблюдается у больных ишемической болезнью сердца, эссенциальной гипертензией, гиперлиппротеидемией, сахарным диабетом, у больных хирургического профиля до оперативных вмешательств, пациентов с посттромбофлебитическим синдромом, хронической никотиновой интоксикацией, инфекционными заболеваниями и других состояниях [9, 16, 29]. Методические подходы, используемые для определения циркулирующих в крови эндотелиоцитов, разнообразны. Они включают количественное определение эндотелиальных клеток с помощью иммуноцитометрии и иммуномагнитометрии. Наиболее простым и доступным в экспериментальной и клинической практике является метод определения количества циркулирующих в крови эндотелиоцитов с использованием световой микроскопии [20, 25]. Исследуемую кровь (3-5 мл) с добавлением 3,2% цитрата натрия в соотношении 9:1 центрифугируют (1000 об/мин.) 10 минут для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. В полученную плазму для стимуляции агрегации тромбоцитов добавляют 0,1% раствор АДФ (0,4 мл на 1 мл плазмы). Агрегаты тромбоцитов осаждают при повторном 10 минутном центрифугировании плазмы (1000 об/мин.). Затем 1 мл надосадочной плазмы переносят в другую пробирку и вновь центрифугируют в течение 20 минут при тех же условиях. После удаления надосадочной плазмы к осадку, содержащему эндотелиоциты, добавляют 0,1 мл 0,85% раствора NaCl, перемешивают стеклянной палочкой и полученную взвесь эндотелиоцитов переносят в камеру Горяева для подсчета в двух сетках.

Определение количества циркулирующих в крови эндотелиоцитов наряду с изложенными выше методами изучения сосудодвигательных эффектов эндотелия широко используется в условиях эксперимента с целью комплексной оценки морфо-функциональных свойств эндотелия сосудов при многих заболеваниях, сопровождающихся развитием сосудистых расстройств и дисфункции эндотелия.

Авторы публикации выражают искреннюю признательность и глубокую благодарность профессору Р. Грыглевскому и доценту С. Хлопицкому за любезно предоставленную возможность освоить описанные выше методы и реализовать отдельные фрагменты НИР на базе Research Medical Center Ягелонского университета г. Кракова.

### Литература:

1. Вильчук К. У., Максимович Н.А., Максимович Н.Е. Функциональные пробы, применяемые в диагностике дисфункции эндотелия // Методические рекомендации МЗ РБ. – Гродно.- 2001. – 19 с.
2. Зайнулина М. С., Мозговая Е. В., Свечников П. Д., Хмельницкая К. Диагностическая ценность определения циркулирующих в крови эндотелиальных клеток // Сб. науч. работ «Патофизиология микроциркуляции и гемостаза» под ред. Н. Н. Петрищева.- С.-Петербург.- 1998.- С. 384-385.
3. Зинчук В. В., Максимович Н. А., Борисюк М. В. Функциональная система транспорта кислорода: фундаментальные и клинические аспекты. - Гродно.- 2003.- 236 с.
4. Лобанок М. М., Лукша Л. С. Функциональная роль эндотелия сосудов: патофизиологические и клинические аспекты// Мед. новости.- 1992.-№ 4.-С.21-29.
5. Стенина О. И., Захарова О. С., Бобрышев Ю. В., Репин В. С. Повреждения эндотелия и их роль в патологии сосудистой стенки// ВИНТИ. Сер. Физиология человека и животных. Т. 38. Роль эндотелия в физиологии и патологии сосудов.- М. 1989. - 138 с.
6. Шебеко В. И. Эндотелий и система комплемента.- Витебск.- 1999.- 150 с.
7. Audibert G., Saunier C.G., Siat J. Effect of the inhibitor of nitric oxide synthase, N<sub>G</sub>-nitro-L-arginine-methyl-ester on cerebral and myocardial blood flows during hypoxia in the awake dog// Anesthesia and Analgesia.-1995.-V. 81(5).- P.945-951.
8. Bellan J. A., Longenecker L.L., Kadowitz P. J. Selective blockade of acetylcholine-induced relaxation in rabbit aortic rings by N-sup-omega-nitro-L-arginine, but not by glybenclamide// Eur. J. Pharmacol. - 1993. - V. 234. -P. 273 - 276.
9. Bouvier C. A., Gaynor E., Cintron J. R. Et al. Circulating endothelium as an indication of vascular injury// Thromb. Diath. Haemorrh.-1970.-V. 40. - P.163.
10. Bendall J. K., Heymes C., Wright T. J. et al. Strain-dependent variation in vascular responses to nitric oxide in the isolated murine heart // J. Mol. Cell Cardiol. - 2002. - V.34. - P. 1325-1333.
11. Busse R., Fleming I. The endothelial organ // Curr. Opin. Cardiol. - 1993.- V.8. - P.719-727.
12. Chong, A.Y., Blann, A. D. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure // Q.J.M. – 2003. - V.96. – P.253-267.
13. Chlopicki S., Gryglewski R. J. The endothelium-dependent and the endothelium-independent vasodilators in the isolated, perfused guinea pig heart // J Physiol Pharmacol. – 1992. – Vol. 43. – P. 353-365.
14. Chlopicki S., Nilsson H., Mulvany J. Initial and sustained phases of myogenic response of rat mesenteric small arteries // Am. J. Physiol. Circ. Physiol. – 2001.- V. 281.- P. H2176-H21183.
15. Diet F., Pratt R.E., Berry G.J. et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease // Circulation. – 1996. – Vol. 94. – P. 2756 – 2767.
16. Dignat-George F., Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept // Eur. J. Haematol.- 2000.-V. 65.-P. 215–220.
17. Drexler H., Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease // J Moll Cell Cardiol. – 1999. – Vol. 31. – P. 51 – 60.
18. Felmeden D.C., Spencer C.G, Belgore F.M., Blann A.,D., Beevers D.G., Lip G.Y. Endothelial damage and angiogenesis in hypertensive patients: relationship to cardiovascular risk factors and risk factor management // Am J Hypertens. – 2003. Vol. 16. – P. 11 – 20.
19. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature.-1980.-V.288.-P.373-376.
20. Hladovec, J., and Rossman, P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats // Thromb. Res.- 1973.- V.3. – P. 665-674.
21. Holm T., Aukrust P., Andreassen A.K., et al. Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: possible role of proinflammatory cytokines // Clin Transplant. – 2000. – Vol. 14. – P. 218 – 225.
22. Hortsman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Ahn Y.S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction // Front Biosci. – 2004. – Vol. 9. – P. 1118 – 1135.
23. Hobbs A. J., Ignarro L. J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system // Methods in Enzymology.-1996.-V. 269. - P.134-148.
24. Ku D. D. Nitric oxide- and nitric oxide donor-induced relaxation // Methods in Enzymology.- 1996.- V. 269.- P.107-119.
25. Sinzinger H., Virgolini J., Fitscha P. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulation endothelial cells // Br. J. Pharm.- V.25.-1988.-P.775-776.
26. Sutherland F. J., Hearse D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart // Pharmacol Res. – 2000. - V. 41.- P. 613-627.
27. Tejerina T., Sesin J., Delgado C., Tarnago J. Effect of milrinone contractility and Ca<sup>2+</sup> movements in the isolated rabbit aorta // Rur. J. Pharmacol.- 1988. - V.148. - P. 239-245.
28. Widlansky M.E. Gokse N., Keaney J.F., Vita J.A. The clinical implications of endothelial dysfunction // J Am Coll Cardiol. – 2003. – P. 1149 – 1160.
29. Woywodt A., Bahlmann F. H., de Groot K. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer // Nephrol. Dial. Transplant. - 2002. - V.17. - P.1728 - 1730.