

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.24.007

严重高甘油三酯血症小鼠血液流变学的异常分析*

柳鑫¹ 王宇辉² 刘国庆² 王绿娅³ 赵志刚^{1Δ}

(1 首都医科大学附属北京天坛医院药学部 北京 100050; 2 北京大学医学部基础医学院心血管研究所 北京 100191;

3 首都医科大学附属北京安贞医院动脉硬化研究室 北京 100029)

摘要 目的:本研究旨在检测两种严重高甘油三酯血症(HTG)小鼠的血液流变学,建立具有异常血液流变学特点的 HTG 小鼠模型,以应用于进一步的相关机制研究。**方法**:采用 ApoC3 转基因与 GPIIIBP1 基因敲除的 HTG 小鼠及野生型小鼠,所用小鼠均为 C57BL/6J 背景下 8 周龄雄性小鼠,通过生物物理法检测和比较其血浆粘度、红细胞渗透脆性、变形性与电泳率。**结果**:与野生小鼠相比,ApoC3 转基因与 GPIIIBP1 基因敲除的 HTG 小鼠血浆甘油三酯含量明显升高($P<0.05$),红细胞渗透脆性显著增加($P<0.05$),变形指数与电泳率明显降低($P<0.05$),血浆粘度显著升高($P<0.05$),但血细胞计数等血常规指标均未见显著差异($P>0.05$)。**结论**: ApoC3tg 与 GPIIIBP1KO 小鼠血液流变学发生异常改变,可能作为探讨 HTG 血液流变学异常和动脉粥样硬化心血管疾病病理机制的动物模型。

关键词:严重高甘油三酯血症;ApoC3 转基因;GPIIIBP1 基因敲除;血液流变学

中图分类号:R-33;R543.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2018)24-4638-05

Analysis of the Hemorheological Abnormalities in Mice with Severe Hypertriglyceridemia*

LIU Xin¹, WANG Yu-hui², LIU Guo-qing², WANG Lv-ya³, ZHAO Zhi-gang^{1Δ}

(1 Depart of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China;

2 Institute of Cardiovascular Sciences, School of Basic medicine, Peking University Health Science Center, Beijing, 100191, China;

3 Atherosclerosis Research Lab, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To establish a mouse model of hypertriglyceridemia with hemorheological abnormalities for mechanisms researches. **Methods**: ApoC3 gene transgenic and GPIIIBP1 gene knock-out mice with severe hypertriglyceridemia were used to detect the plasma viscosity, erythrocyte osmotic fragility, deformity, and electrophoresis rate by biophysical methods in comparison with the wild type mice. All C57BL/6J male mice were aged 8 weeks. **Results**: Compared with the wild-type group, severe hypertriglyceridemic mice had higher plasma levels of triglyceride, increased plasma viscosity, larger osmotic fragility, lower maximum erythrocyte deformation index, lower erythrocyte electrophoresis rate of red blood cells ($P<0.05$). However, no significant change was observed in the blood cell counts between two groups. **Conclusions**: ApoC3 transgenic and GPIIIBP1 knock-out mice demonstrated hemorheological abnormalities. These two mouse models might be applied for the researches on pathological mechanisms for atherosclerotic cardiovascular disease with between hemorheological abnormalities under severe hypertriglyceridemia.

Key words: Severe Hypertriglyceridemia; ApoC3 Transgenic; GPIIIBP1 Knock out; Hemorheology abnormalities

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.5 **Document code**: A

Article ID: 1673-6273(2018)24-4638-05

前言

严重高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)引起动脉粥样硬化易感^[1],是冠心病的重要危险因素^[2],血浆中高浓度的乳糜微粒与极低密度脂蛋白对血液流变学改变有重要作用,但至今没有很好的疾病动物模型应用于相关机制研究^[3,4]。通过高脂饲料无法引起小鼠血浆甘油三酯(triglyceride, TG)水平升高,

采用 TritonWR1339 注射虽然能使血浆 TG 含量升高 4-5 倍,但仅能维持 24 小时,且对动物全身影响较大。早期有学者使用脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)基因敲除的严重 HTG 小鼠探索 HTG 引起动脉粥样硬化机制,发现该模型血液流变学改变,主要表现为血液黏度升高、红细胞渗透脆性增加、红细胞体积变大^[5]。这种严重 HTG 模型繁殖过程较复杂,在出生时即需要采取腺病毒注射 LPL 有益突变体 S447X 进行救治,给实验

* 基金项目:北京天坛医院青年基金项目(YQN07);北京市医院管理局青苗人才项目(QML20170507);首都医科大学基础与临床科研合作基金项目(JL1767);首都医科大学自然科学基金项目(PYZ2017094);国家自然科学基金项目(81670811,81471098)

作者简介:柳鑫(1984-),男,博士研究生,主要研究方向:临床药学,E-mail: liuxinmj@aliyun.com

Δ 通讯作者:赵志刚(1967-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:临床药学,E-mail: 1022zzg@sina.com,电话:01067096903

(收稿日期:2018-10-04 接受日期:2018-10-30)

带来很大不便。为了探索严重 HTG 下血液流变学异常与急性胰腺炎及动脉粥样硬化等心血管疾病病理机制的相互关系,亟需新的严重 HTG 动物模型。

在甘油三酯代谢中,除 LPL,ApoC2、GPIHBP1 与 ApoA5 等基因突变均能引起家族性严重 HTG^[6-8]。ApoC3 是由肝脏和小肠合成并分泌入血的一种载脂蛋白,能够抑制 ApoC2 对 LPL 的激活作用,同时提高肝脏内 VLDL 生成,降低清除率和加速小而密的 LDL 生成^[9]。GWAS 研究与流行病学调查显示携带 ApoC3 基因突变的人群空腹或餐后 TG 含量更低,动脉粥样硬化与冠心病发病风险更低^[10,11]。ApoC3 参与糖脂代谢调节,可能在 II 型糖尿病合并 HTG 的疾病进展中发挥重要作用^[12]。GPIHBP1 是一种锚定在血管内皮细胞的糖蛋白,能够与 LPL 发生特异性结合,作为载体参与 LPL 向血管内皮细胞的转运^[13,14]。当 LPL 与 GPIHBP1 结合时,ApoC3 对 LPL 水解 TG 具有更强抑制作用^[15]。当患者体内携带 GPIHBP1 自身抗体时,血浆 TG 含量极度升高,也表现出严重 HTG^[16]。

因此,无论过表达 ApoC3 或敲除 GPIHBP1 基因,均能引起血浆 TG 水平极度升高。为了验证 ApoC3 基因转基因与 GPIHBP1 基因敲除的严重 HTG 基因工程小鼠是否也发生血液流变学改变,我们使用 ApoC3 基因转基因 (ApoC3 trans-

genic,ApoC3tg) 与 GPIHBP1 基因敲除 (GPIHBP1 knockout, GPIHBP1KO)的严重 HTG 基因工程小鼠模型,并与野生型小鼠比较,分析其血液流变学变化。

1 材料与方法

1.1 材料

甘油三酯、葡萄糖、总胆固醇测定试剂盒购自北京中生北控生物科技公司;DNA 聚合酶购自 Takara 公司;聚乙烯吡咯烷酮、枸橼酸钠及肝素购自美国 Invitrogen 公司;ApoC3tg 小鼠与 GPIHBP1KO 小鼠分别由美国 Jackson 实验室和 MMRRC 提供,野生型小鼠购自北京大学医学部实验动物中心;激光衍射变形仪(LG-B-190)购自北京中勤世帝公司;台式冷冻高速离心机 (5810-R) 购自德国 Eppendorf 公司;全自动酶标仪 (Bio-Rad-550)及 Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与基因鉴定 将实验小鼠分为三组:野生型 (wild type, WT)、ApoC3tg 与 GPIHBP1KO 组,每组 6 只。所用小鼠均为 C57BL/6J 背景下 8 周龄雄性小鼠,提取鼠尾 DNA,采用 PCR 鉴定基因型。所采用的引物见表 1。

表 1 基因鉴定的引物序列
Table 1 Primers used in genotype identification

Gene	Primers	PCR product
ApoC3tg	Forward: AGCTGGCATAGCAGAGGTGT	ApoC3 tg: 60bp
	Reverse: GCAGCCTCTCATTTGGAAG	
GPIHBP1KO	Forward: GGTGATGCGGACCCGGAG	GPIHBP1KO 519bp
	Reverse: GTGTCTGATTGCAGCTCTCC	
	Forward: GGAGGCCTACACTAGAAGG	GPIHBP1KO 655bp
	Reverse: GCAGCGCATCGCCTTCTATC	

1.2.2 血脂检测 自小鼠眶静脉采血,4℃,12000 rpm 离心 10 min,取上层血浆,利用生化检测试剂盒测定三组小鼠(WT、ApoC3tg 与 GPIHBP1KO)血浆 TG、总胆固醇(TC)、葡萄糖(Glucose, GLU)含量。

1.2.3 血常规检测 自三种小鼠静脉采不抗凝血 20 μL,加入 2 mL 稀释液里,混匀,采用血细胞计数仪测量。

1.2.4 血液流变学检测 肝素抗凝,静脉采血,加入 LG-B-190 型激光衍射仪,测定 50S⁻¹、100S⁻¹、200S⁻¹ 切变率下的血浆粘度;用微量压积管吸取抗凝血 10 μL,37℃,15000 r/m,离心 5 min,计算红细胞压积;取抗凝血 40 μL,加入 15%聚乙烯吡咯烷酮溶液中,取 800 μL 混合液,检测红细胞变形指数;取抗凝血 20 μL,与等渗 PBS 溶液 1mL 混匀,取 800 μL 混合液上样,取 20 μL 抗凝血分别加至不同浓度 PBS 溶液中,3000 rpm,离心 5 min,比色波长 540 nm,以渗透压为 295 mOsm/kg 的 PBS 管的上清液为空白对照,检测各管上清液的透光率 (Transmission rate, Tr),计算细胞溶解率 (Haemolysis rate, Hr)。Hr=Tr (295)-Tr/Tr (295)-Tr(0)*100%。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,实验数据以均数±标准差(X 平均±SD)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK-q 检验,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重与生化指标比较

和野生型小鼠相比,严重 HTG 小鼠血浆 TG 及 TC 水平显著升高(P<0.05),但其体重与血糖水平比较没有明显差异(P>0.05),见图 1。

2.2 各组小鼠血常规比较

与野生型小鼠相比,严重 HTG 小鼠血液中红细胞数、白细胞数、血小板数、血红蛋白含量、红细胞平均容量、血小板体积分布宽度、血小板平均体积、血小板压积等血常规指标均无显著差异,见表 2。

2.3 各组小鼠血液流变学指标的比较

与野生型小鼠相比,严重 HTG 小鼠的变形指数、取向指数及小变形指数均明显降低(图 2)。

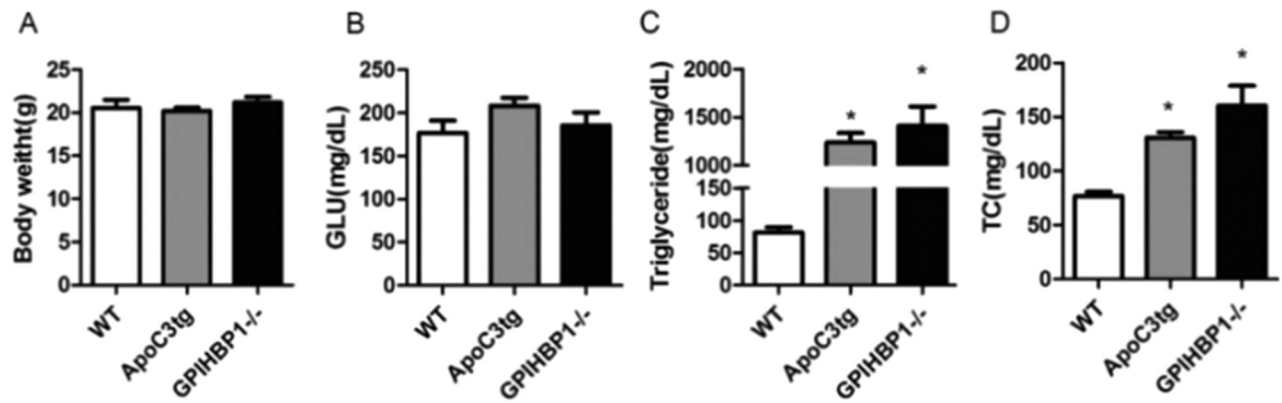


图1 严重 HTG 小鼠与野生小鼠体重与血生化指标比较

Fig.1 Comparison of the body weight and biochemical parameters between severe HTG and wild type mice

Note: n=6. *P<0.05, compared with the wild type group.

表 2 严重 HTG 小鼠与野生型小鼠血常规检测结果比较(X 平均± SD)

Table 2 Comparison of the results of routine blood index between severe HTG and wild type mice (Xaverage± SD)

Categories	WT mice	ApoC3 tg mice	GPIHBP1KO mice
PLT (× 10 ⁹ /L)	272.5± 39.83	270.3± 81.10	276.4± 69.20
RBC (× 10 ¹² /L)	9.23± 0.78	9.03± 1.16	8.68± 0.87
HGB (g/L)	131± 14.07	129.33± 19.16	133± 6.5
MCV (fL)	44.13± 1.55	43.38± 0.97	41.65± 2.32
PCT (%)	13.64± 6.74	12.73± 4.67	11± 3.16
WBC (× 10 ⁹ /L)	6.64± 0.74	6.73± 0.67	7.17± 0.56
MPV (fL)	3.73± 0.24	3.75± 0.22	3.68± 0.11
PDW (%)	13.65± 0.51	13.74± 0.67	13.35± 0.73

Note: PLT, platelet; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume ; PCT, thrombocytocrit; WBC, white blood cell; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet distribution width.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6.

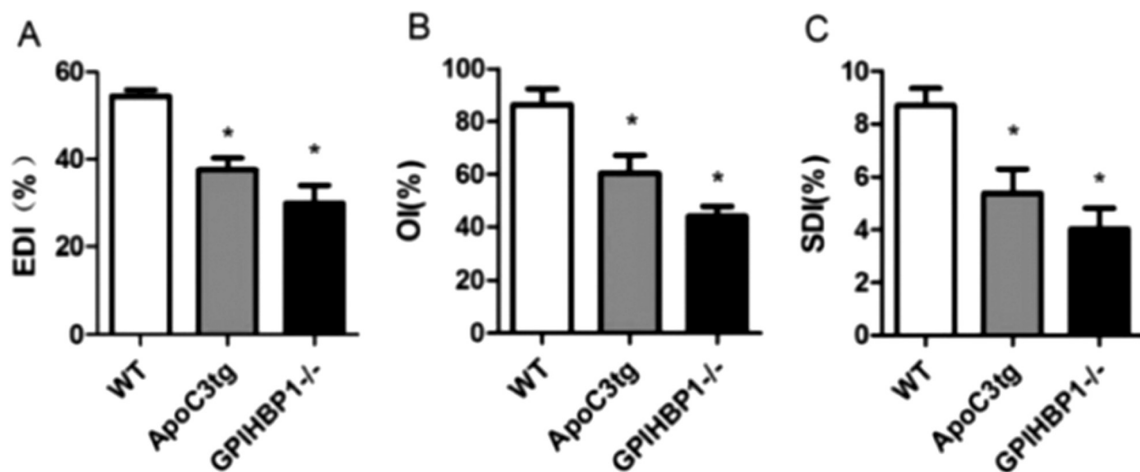


图2 严重 HTG 小鼠与野生小鼠红细胞变形性比较

Fig.2 Comparison of the body weight and biochemical parameters between severe HTG and wild type mice

Note: n=6. *P<0.05, compared with wild type group.

与野生型小鼠相比,严重 HTG 小鼠的红细胞电泳率明显降低(P<0.05),红细胞压积没有显著差异(P>0.05);在渗透压降至 175 mOsm/kg 时,GPIHBP1KO 小鼠红细胞破碎明显增加,破碎率达到 45.4%(P<0.05),ApoC3tg 小鼠仅有少数红细胞发

生破碎,破碎率为 17.3%(P>0.05),在渗透压降至 145 mOsm/kg 时,GPIHBP1KO 小鼠与 ApoC3tg 小鼠红细胞破碎均明显增加(P<0.05),破碎率分别达到 93.5%与 75.4%,见图 3。

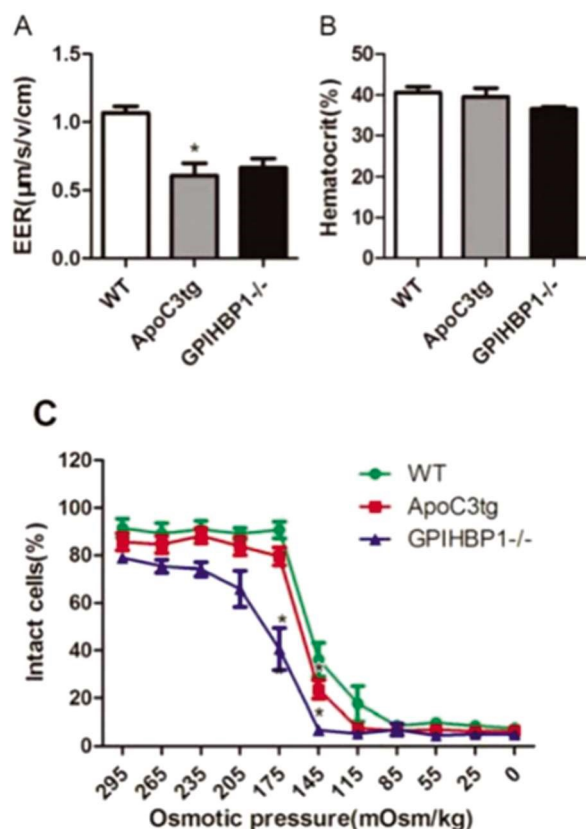


图3 严重HTG小鼠与野生小鼠红细胞电泳率、红细胞压积与渗透脆性

Fig.3 Comparison of the erythrocyte electrophoresis rate, hematocrit and osmotic fragility between severe HTG and wild type mice

Note: n=6. *P<0.05, compared with wild type group.

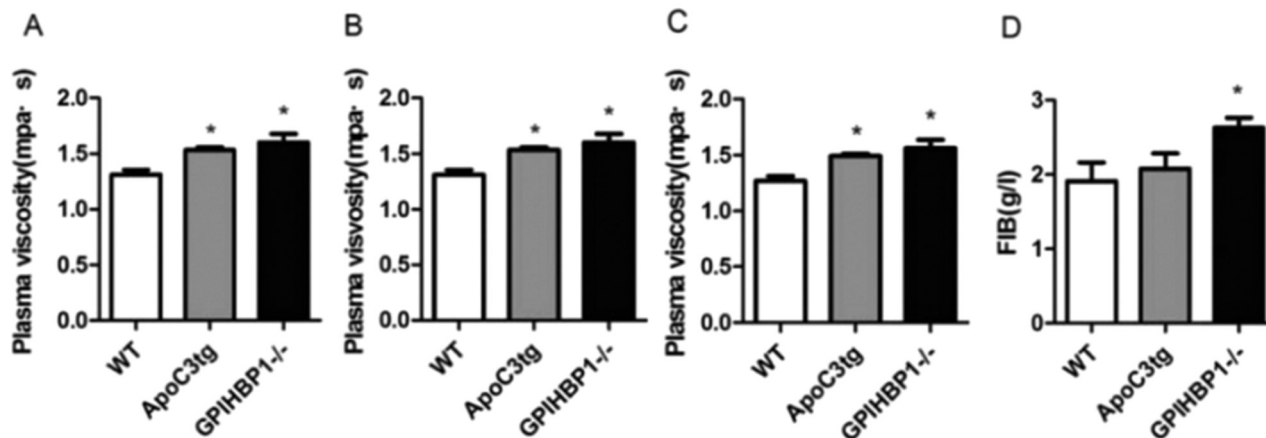


图4 严重HTG小鼠与野生小鼠不同切变率下的血浆粘度的比较

Fig.4 Comparison of the plasma viscosity under different shear rates between severe HTG and wild type mice

Note: n=6. *P<0.05, compared with wild type group.

度。血浆粘度主要反映血液流变学特性,作为影响血流阻力的重要参数,受血液组分、组分间作用与自身血流状态等因素影响^[20]。血浆粘度在一定程度上能够体现红细胞变形性、聚集性以及红细胞压积等指标变化,当血浆粘度升高、血流阻力增加和血流速度缓慢时,不仅降低了组织的血液灌流量,而且使红细胞、白细胞和血小板向血管内皮的粘附能力增强,极易导致血栓的形成^[20];红细胞变形性是描述红细胞在流动中形状变化的能力,良好的变形能力是红细胞运输 O₂ 和保持微循环正常灌注的必

与野生型小鼠相比,严重 HTG 小鼠在低切变率 50S-1、中等切变率 100S-1 与高切变率 200S-1 下,血浆粘度均显著升高(P<0.05);ApoC3tg 小鼠纤维蛋白原含量升高,无统计学差异;GPIHBP1KO 小鼠纤维蛋白原含量明显升高(P<0.05),见图 4。

3 讨论

流行病学调查研究显示我国 HTG 发生率约为高胆固醇血症的 4 倍,临床大样本前瞻性研究也分析指出 HTG 可作为动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素^[17,18]。HTG 导致动脉粥样硬化的机制尚不明确,早期动物实验显示 HTG 可以出现自发性动脉粥样硬化,但应用的模型存在许多问题^[19,20]。血管内皮功能紊乱与动脉粥样硬化的发生密切相关^[21-23],而血液流变学的异常能够引起血管内皮功能紊乱^[24]。因此,探索 HTG 下血液流变学的改变对动脉粥样硬化机制探索具有重要的理论意义和实用价值。为了探讨严重 HTG 下血液流变学的改变,建立合适的动物模型,我们使用了两种特殊的基因工程动物模型:ApoC3tg 与 GPIHBP1KO 小鼠。这两种严重 HTG 动物模型血浆 TG 水平均大于 1000mg/dL,是目前可以得到的较为理想的严重 HTG 小鼠模型。

血液流变学可以影响体内血流灌注,血浆粘度升高、红细胞电泳迁移率下降等血液流变学异常可导致毛细血管内皮细胞损伤、微血流阻力增大,特别是微静脉及小静脉中血流阻力增大,进而产生组织缺血性微循环障碍^[25-27]。严重 HTG 小鼠发生血栓易形成性的血液流变学改变,红细胞变形能力显著降低,表面电荷量减少,红细胞容易产生聚集,从而增加血浆粘

要条件^[30],严重 HTG 小鼠红细胞的变形性下降,增加了红细胞被破坏和清除的机率,取向指数明显降低,反映严重 HTG 小鼠红细胞膜表面细微结构发生了改变;严重 HTG 小鼠的小变形指数明显改变,表明严重 HTG 小鼠红细胞膜脂流动性降低;红细胞渗透脆性代表着红细胞在低渗透压下的耐受能力,反映红细胞膜的力学特性,严重 HTG 小鼠红细胞渗透脆性增加,同样能增加红细胞破碎率。

综上所述,ApoC3 基因转基因与 GPIHBP1 基因敲除的严

重HTG小鼠发生血液流变学改变,与临床严重HTG患者相似,繁殖容易,应用方便,可以作为探讨严重HTG下血液流变学异常与动脉粥样硬化等心血管疾病相关病理机制的良好模型。本研究首次使用ApoC3tg与GPIHBP1KO的严重高甘油三酯血症小鼠模型进行血液流变学探索,以促进科学研究向临床实践转化为目标,研究结果在一定程度上阐明了严重高甘油三酯血症与动脉粥样硬化相关的分子机制,进一步丰富了脂代谢-血液流变学紊乱的理论,拓展了高甘油三酯血症对动脉粥样硬化作用的研究。

参考文献(References)

- [1] Zhang X, Qi R, Xian X, et al. Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet[J]. *Circulation research*, 2008, 102(2): 250-256
- [2] Reiner Z. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease[J]. *Nature reviews Cardiology*, 2017, 14(7): 401-411
- [3] Popa M, Tahir S, Elrod J, et al. Role of CD40 and ADAMTS13 in von Willebrand factor-mediated endothelial cell-platelet-monocyte interaction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(24): E5556-e5565
- [4] Otto C, Ritter MM, Richter WO, et al. Hemorrhologic abnormalities in defined primary dyslipoproteinemias with both high and low atherosclerotic risks[J]. *Metabolism: clinical and experimental*, 2001, 50(2): 166-170
- [5] Zhao T, Guo J, Li H, et al. Hemorheological abnormalities in lipoprotein lipase deficient mice with severe hypertriglyceridemia [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006, 341(4): 1066-1071
- [6] Dron JS, Wang J, Cao H, et al. Severe hypertriglyceridemia is primarily polygenic [J]. *Journal of clinical lipidology*, 2018 [Epub ahead of print]
- [7] Cabello I, Alia P, Pinto X, et al. Association of APOA5 and APOC3 Genetic Polymorphisms With Severity of Hypertriglyceridemia in Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma Treated With Bexarotene [J]. *JAMA dermatology*, 2018[Epub ahead of print]
- [8] Guardiola M, Ribalta J. Update on APOA5 Genetics: Toward a Better Understanding of Its Physiological Impact[J]. *Current atherosclerosis reports*, 2017, 19(7): 30
- [9] Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome [J]. *The New England journal of medicine*, 2014, 371(23): 2200-2206
- [10] Pollin TL, Damcott CM, Shen H, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection[J]. *Science (New York, NY)*, 2008, 322(5908): 1702-1705
- [11] Crosby J, Peloso GM, Auer PL, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease [J]. *The New England journal of medicine*, 2014, 371(1): 22-31
- [12] Caron S, Verrijken A, Mertens I, et al. Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011, 31(3): 513-519
- [13] Vallerie SN, Bornfeldt KE. GPIHBP1: two get tangled[J]. *Circulation research*, 2015, 116(4): 560-562
- [14] Kristensen KK, Midtgaard SR, Mysling S, et al. A disordered acidic domain in GPIHBP1 harboring a sulfated tyrosine regulates lipoprotein lipase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(26): E6020-e6029
- [15] Larsson M, Allan CM, Jung RS, et al. Apolipoprotein C-III inhibits triglyceride hydrolysis by GPIHBP1-bound LPL[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(9): 1893-1902
- [16] Beigneux AP, Miyashita K, Ploug M, et al. Autoantibodies against GPIHBP1 as a Cause of Hypertriglyceridemia [J]. *The New England journal of medicine*, 2017, 376(17): 1647-1658
- [17] Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies[J]. *Circulation*, 2007, 115(4): 450-458
- [18] Tada H, Nomura A, Okada H, et al. Clinical whole exome sequencing in severe hypertriglyceridemia [J]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2018, 488: 31-39
- [19] Peritz LN, Brunzell JD, Harvey-Clarke C, et al. Characterization of a lipoprotein lipase class III type defect in hypertriglyceridemic cats[J]. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*, 1990, 13(5): 259-263
- [20] Conde-Knape K, Bensadoun A, Sobel JH, et al. Overexpression of apoC-I in apoE-null mice: severe hypertriglyceridemia due to inhibition of hepatic lipase[J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(12): 2136-2145
- [21] Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis [J]. *Circulation research*, 2016, 118(4): 620-636
- [22] Peng J, Luo F, Ruan G, et al. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis[J]. *Lipids in health and disease*, 2017, 16(1): 233
- [23] Madhu S, Sinha B, Aslam M, et al. Postprandial triglyceride responses and endothelial function in prediabetic first-degree relatives of patients with diabetes [J]. *Journal of clinical lipidology*, 2017, 11(6): 1415-1420
- [24] Kumar S, Kim CW, Simmons RD, et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs[J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2014, 34(10): 2206-2216
- [25] Zhang XL, Shi KQ, Jia PT, et al. Effects of platelet-rich plasma on angiogenesis and osteogenesis-associated factors in rabbits with avascular necrosis of the femoral head [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2018, 22(7): 2143-2152
- [26] Lip GY, Blann AD, Jones AF, et al. Relation of endothelium, thrombogenesis, and hemorheology in systemic hypertension to ethnicity and left ventricular hypertrophy[J]. *The American journal of cardiology*, 1997, 80(12): 1566-1571
- [27] Vedula R, Vaidya A, Galetta K, et al. A Sticky Situation[J]. *The New England journal of medicine*, 2018, 379(13): e22
- [28] Peters SA, Woodward M, Rumley A, et al. Plasma and blood viscosity in the prediction of cardiovascular disease and mortality in the Scottish Heart Health Extended Cohort Study[J]. *European journal of preventive cardiology*, 2017, 24(2): 161-167
- [29] Gertz MA. Acute hyperviscosity: syndromes and management [J]. *Blood*, 2018, 132(13): 1379-1385
- [30] Gwozdziński L, Pieniązek A, Bernasinska J, et al. Erythrocytes properties in varicose veins patients[J]. *Microvascular research*, 2017, 111: 72-79