

Влияние полиморфных вариантов гена эндотелиальной синтазы окиси азота на развитие и течение хронической сердечной недостаточности

Н.Ф. Яковлева¹, С.Д. Маянская¹, А.В. Яковлев¹, М.Л. Филипенко², Е.Н. Воронина², Е.Н. Березикова¹, С.Н. Шилов¹, Т.И. Захарова¹

¹Новосибирский государственный медицинский университет; ²Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Новосибирск, Россия

Influence of endothelial NO synthase gene polymorphisms on development and prognosis of chronic heart failure

N.F. Yakovleva¹, S.D. Mayanskaya¹, A.V. Yakovlev¹, M.L. Filipenko², E.N. Voronina², E.N. Berezikova¹, S.N. Shilov¹, T.I. Zakharova¹.

¹Novosibirsk State Medical University; ²Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences. Novosibirsk, Russia.

Цель. Изучить влияние полиморфных вариантов гена eNOS (Glu298Asp и VNTR intron 4) на развитие дисфункции эндотелия (ДЭ), а также на тяжесть и характер прогрессирования хронической сердечной недостаточности (ХСН) у больных ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией.

Материал и методы. Обследованы 165 пациентов с ХСН: основная группа (ОГ) – 121 мужчина и 44 женщины; средний возраст 56,7±5,3 лет. Сосудодвигательную функцию эндотелия оценивали ультразвуковым методом в пробе с реактивной гиперемией и нитроглицерином. Идентификацию генотипов проводили с помощью ПДРФ-анализа ПЦР-продуктов. Группу контроля (ГК) составили 114 человек: 54 мужчины и 60 женщин; средний возраст 53,2±4,9.

Результаты. Генотип Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp достоверно чаще встречался у больных с ХСН по сравнению с ГК ($p<0,05$), а генотип Glu/Asp достоверно чаще в ГК ($p<0,01$). Частота генотипа Glu/Glu у пациентов с функциональным классом (ФК) I (NYHA) была достоверно меньше по сравнению с пациентами с ФК II и с ФК III-IV ($p<0,05$). Было обнаружено, что среди пациентов с неблагоприятным течением ХСН генотип Glu/Glu распространен чаще, чем у пациентов с благоприятным течением заболевания – 75,7% и 43,2% соответственно ($p<0,05$). При оценке систолической функции левого желудочка этот генотип чаще выявляли у пациентов с фракцией выброса <50%, хотя различия не были достоверными. Вызванная потоком дилатация плечевой артерии у больных с генотипом Glu/Glu, достоверно ниже, чем у больных, имеющих аллель Asp298 ($p<0,01$). По данным распределения частот аллелей и генотипов другого полиморфного варианта гена eNOS (VNTR intron 4) у больных с ХСН достоверных различий с ГК получено не было.

Заключение. Выявлена ассоциация аллелей полиморфного локуса Glu298Asp гена eNOS с риском развития и характером течения ХСН, а также с формированием сосудодвигательной ДЭ.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, полиморфизм гена, eNOS, дисфункция эндотелия.

Aim. To study the effects of eNOS gene polymorphisms (Glu298Asp and VNTR intron 4) on endothelial dysfunction (ED) development, chronic heart failure (CHF) severity and progression in patients with coronary heart disease (CHD) and arterial hypertension (AH).

Material and methods. In total, 165 CHF patients were examined (121 men, 44 women; mean age 56,7±5,3 years). Vasomotor endothelial function was evaluated by ultrasound method in reactive hyperemia and nitroglycerin tests. Genotypes were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism analysis. The control group consisted of 114 persons (54 men, 60 women; mean age 53,2±4,9 years).

Results. Glu/Glu genotype of Glu298Asp polymorphic loci was identified in CHF patients significantly more often than in controls ($p<0,05$), and Glu/Asp genotype was significantly more prevalent in controls ($p<0,01$). Glu/Glu genotype prevalence in patients with Functional Class (FC) I (NYHA) was significantly lower than in those

with FC II or FC III-IV ($p < 0,05$). Moreover, Glu/Glu genotype was more prevalent in patients with unfavourable CHF clinical course than in those with more favourable CHF course (75,7% and 43,2%, respectively; $p < 0,05$). This genotype was also more prevalent in patients with left ventricular ejection fraction $< 50\%$, but the difference was not statistically significant. Flow-induced dilatation of brachial artery was significantly lower in patients with Glu/Glu genotype than in those with Asp298 allele ($p < 0,01$). Distribution of alleles and genotypes of another eNOS gene polymorphism (VNTR intron 4) was similar in CHF patients and controls.

Conclusion. Alleles of eNOS gene Glu298Asp polymorphism were associated with CHF development risk and CHF clinical course features, as well as with vasomotor ED development.

Key words: Chronic heart failure, gene polymorphism, eNOS, endothelial dysfunction.

Своевременная профилактика и ранняя диагностика различных заболеваний являются актуальными проблемами современной медицины. Исследования генома человека сделали реальной раннюю, досимптомную диагностику не только генных, но и многих мультифакториальных заболеваний [1]. На практике такая цель может быть достигнута путем молекулярного тестирования генов, получивших название генов “предрасположенности” или генов-кандидатов [2,3]. Последние можно определить как гены, наследственные варианты (полиморфизмы) которых совместимы с жизнью, но в сочетании с неблагоприятными внешними факторами (лекарства, продукты питания, вредные привычки, инфекции, загрязнения окружающей среды) могут стать причиной различных патологических состояний и заболеваний.

Давно доказано, что в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний вообще и хронической сердечной недостаточности (ХСН) в частности особое место занимает эндотелиальная дисфункция (ЭД). Известно, что одним из механизмов участия ЭД в патогенезе ХСН является подавление экспрессии и активности эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS) и снижение синтеза и биодоступности окиси азота (NO). Одной из наиболее современных областей исследования функции eNOS являются полиморфные варианты этого фермента, и как они могут быть соотнесены с сердечно-сосудистым риском [4,5].

В доступной литературе отсутствуют данные о связи полиморфных вариантов гена eNOS с риском развития и характером течения ХСН у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и артериальной гипертензией (АГ), содержится мало информации о влиянии данных полиморфизмов на развитие ЭД. Поэтому целью работы было изучить влияние полиморфных вариантов гена eNOS (Glu298Asp и VNTR intron 4) на возникновение ЭД, а также на развитие и характер прогрессирования ХСН у больных ИБС и АГ.

Материал и методы

Под наблюдением находились 165 пациентов основной группы (ОГ): 121 мужчина и 44 женщины в возрасте 45–65 лет (средний возраст $56,7 \pm 5,3$), которые лечились в стационаре в отделениях неотложной кардиологии

и неотложной терапии по поводу декомпенсации ХСН различной этиологии: ИБС в сочетании с АГ (ИБС + АГ) – 129 случаев, ИБС – 24, АГ – 12 случаев. Из них по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца (НУНА): ХСН I функционального класса (ФК) – 20 (12 %) случаев; II ФК – 86 (52 %); III ФК – 54 (33 %); IV ФК – в 5 (3 %) случаях. У 92 (56 %) пациентов был выявлен постинфарктный кардиосклероз. В зависимости от тяжести течения ХСН все больные были поделены на три группы: I группа – ФК I ($n=37$), II группа – ФК II ($n=69$) и III группа – ФК III и IV ($n=59$).

Клиническое обследование больных ХСН, толерантность к физической нагрузке (ФН) – тест с 6-минутной ходьбой (6мх) и эхокардиографическое исследование (ЭхоКГ) проводились при поступлении в стационар и через 12 месяцев.

Функция эндотелия оценивалась по методике Celermajer DS 1992 на ультразвуковом аппарате линейным датчиком 7 Мг [6]. Плечевую артерию (ПА) визуализировали в продольном сечении на 2–3 см дистальнее локтевого сгиба, диаметр (Д) ПА измеряли в диастолу после 10–15 мин отдыха. Стимулом, вызывающим зависимость от эндотелия дилатацию периферических артерий, была реактивная гиперемия, создаваемая манжетой, наложенной проксимальнее места измерения. На 3 мин создавалось давление, которое на 40–50 мм рт. ст. было выше систолического артериального давления (АД). Сразу после сдутия воздуха из манжеты в течение 15 с (фаза реактивной гиперемии) измеряли Д и скорость кровотока в ПА. Через 15 мин отдыха после восстановления исходного Д ПА проводилась проба с экзогенным донатором азота – сублингвальным нитроглицерином в дозе 0,5 мг. Измерение повторяли через 1 мин. Реакцию на усиление кровотока рассчитывали как разницу Д на фоне реактивной гиперемии и исходного, реакцию на нитроглицерин – как разницу Д на 1-й минуте после приема нитроглицерина и исходного.

Всем пациентам производился забор генетического материала (букальный эпителий) с последующим типированием аллелей гена eNOS (Glu298Asp и VNTR intron 4).

Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали метод фенол-хлороформной экстракции [7]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры, синтезированные в Институте химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН). Структуры праймеров гена eNOS-298: а) прямой – cctgaggaggcatgaggct; б) обратный – tgagggtcacacaggttccct; длина фрагмента – 450 пар нуклеотидов (п.н.).

ПЦР проводили в конечном объеме 12 мкл, содержащем 650 мМ трис.-HCl (pH 8,9), 160 мМ сульфат аммония; 20 мМ $MgCl_2$; 0,5 % Твин 20; 2 мМ dNTP; 0,5 мкМ

Распределение генотипов в группе пациентов и в группе контроля

Генотип	ГК n=114	ОГ n=165	p
Glu/Glu	56 (49,2 %)	111 (67,3 %)	<0,05
Glu/Asp	55 (48,2 %)	45 (27,3 %)	<0,01
Asp/Asp	3 (2,6 %)	9 (5,4 %)	нд
4a/4a	5 (4,4 %)	4 (2,4 %)	нд
4a/4b	27 (23,7 %)	49 (29,7 %)	нд
4b/4b	82 (71,9 %)	112 (67,9 %)	нд

Примечание: нд – недостоверно.

растворы олигонуклеотидных праймеров, 20–100 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию осуществляли на амплификаторе “Eppendorf” с начальной денатурацией при 95°C 3 мин, далее в течение 35 циклов с денатурацией 10 сек при 95°C, отжигом 10 сек при 65°C и синтезом 15 сек при 72°C. Финальная элонгация проводилась при 72°C 5 мин.

Для проведения ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрационных фрагментов) полученных фрагментов ДНК, рестрикцию осуществляли следующим образом. К амплификационной смеси добавляли 1/10 V 10x буфера для рестрикции и эндонуклеазу рестрикции (1–3 ед. акт. фермента) и инкубировали 2 часа при 65°C. Буфер для рестрикции использовали с учетом рекомендаций производителя эндонуклеазы рестрикции. Фермент инактивировали добавлением 1мкл 0,5M ЭДТА.

При гидролизе амплификационного фрагмента гена eNOS эндонуклеазой рестрикции Kzo91I выявлялось пять фрагментов размером 275 п.н., 150 п.н., 145 п.н., 130 п.н. и 25 п.н. Амплификационный фрагмент 450 п.н. содержит два дополнительных непалиморфных сайта узнавания эндонуклеазы рестрикции Kzo91I, которые при гидролизе приводят к появлению фрагментов длиной 275 п.н., 150 п.н. и 25 п.н. Отсутствие после проведения гидролиза фрагмента длиной 450 п.н. служило внутренним контролем полноты прохождения рестрикции. Фрагмент 275 п.н. соответствует фрагменту ДНК, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на присутствие аллеля G (Glu298) полиморфного локуса Glu298Asp гена eNOS. При наличии аллеля T (298Asp) происходит разрезание фрагмента ДНК длиной 275 п.н. на два, размером 145 п.н. и 130 п.н.

Исследовали полиморфный локус NOS-VNTR с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах четвертого интрона, в котором находится переменное количество tandemных повторов – 27 п.н. (VNTR). Структуры праймеров: NOS-VNTR-U – gggtatcaggccctatgtagtg; NOS-VNTR-R – ggagaagccttctctctggg. В результате амплификации детектировали фрагменты ДНК размером 255 и 282 п.н. с 4 и 5 tandemными повторами, соответственно. Эти аллели были обозначены как 4a и 4b.

Анализ продуктов амплификации и гидролиза проводили в 8 % ПААГ, гель окрашивали бромистым этидием с визуализацией ДНК УФ-светом, затем фотографировали с помощью цифровой видеокамеры Vatec (Япония).

Группу контроля (ГК) составили 114 человек: 54 мужчины и 60 женщин в возрасте 45–65 лет (средний возраст 53,2±4,9), не имеющих по данным клинического обследования и электрокардиографии признаков сердечно-сосудистых нарушений.

При статистической обработке результатов использовали стандартный статистический пакет программ SPSS 13,0. Для обнаружения ассоциации применяли стандартные генетико-статистические методы. Парное сравнение контрольных и опытных частот проводилось с помощью точного критерия Фишера и χ^2 для долей с включением поправки Йейтса на непрерывность. Тесты на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга проводились методом χ^2 .

Результаты

Распределение частот генотипов гена eNOS (полиморфные локусы Glu298Asp и NOS-VNTR) в ОГ и в ГК представлены в таблице 1. Наблюдается достоверно большая частота генотипа Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp в ОГ пациентов по сравнению с ГК – 67,3 % и 49,2 % соответственно ($p<0,05$), а генотип Glu/Asp достоверно чаще встречался в ГК по сравнению с ОГ – 48,2 % и 27,3 % соответственно ($p<0,01$). По данным распределения частот генотипов полиморфизма NOS-VNTR у ОГ достоверных различий с ГК получено не было.

При изучении частот генотипов данных полиморфных локусов в зависимости от ФК ХСН было обнаружено, что чем тяжелее была декомпенсация, тем чаще встречался генотип Glu/Glu: ФК I – 54,1 %, ФК II – 71 % и ФК III + ФК IV – 71,2 %; и реже – генотипы Glu/Asp: ФК I – 35,1 %, ФК II – 23,2 % и ФК III + ФК IV – 27,1 %; Asp/Asp: ФК I – 10,8 %, ФК II – 5,8 % и ФК III + ФК IV – 1,7 %. В распределении частот генотипов полиморфизма NOS-VNTR достоверные различия между группами отсутствовали (таблица 2).

При оценке систолической функции левого желудочка у больных с фракцией выброса (ФВ) <50 % и у больных с ФВ >50 % распределение частот генотипов было следующим: Glu/Glu – 72 %, Glu/Asp – 25 %, Asp/Asp – 3 % и Glu/Glu – 63 %, Glu/Asp – 29 %, Asp/Asp – 8 % соответственно. Таким образом, было обнаружено, что генотип Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp чаще встречался у пациентов с ФВ <50 % (72 % vs 63 %), хотя различия оказались не достоверными. В распределении частот генотипов полиморфизма NOS-VNTR достоверных различий также не было найдено.

По истечении 12 месяцев наблюдения с момента включения в исследование все пациенты

Таблица 2

Распределение частот генотипов в зависимости от ФК ХСН (NYHA)

Генотип	Группа I (ФК I) n=37	Группа II (ФК II) n=69	Группа III (ФК III + ФК IV) n=59
Glu/Glu	20 (54,1 %)	49 (71 %)*	42 (71,2 %)*
Glu/Asp	13 (35,1 %)	16 (23,2 %)	16 (27,1 %)
Asp/Asp	4 (10,8 %)	4 (5,8 %)	1 (1,7 %)
4a/4a	1 (2,7 %)	2 (3 %)	1 (1,7 %)
4a/4b	11 (29,7 %)	21 (30 %)	17 (28,8 %)
4b/4b	25 (67,6 %)	46 (67 %)	41 (69,5 %)

Примечание *- достоверность различий по сравнению с ФК I, $p < 0,05$.

в зависимости от частоты повторных госпитализаций, интенсивности нарастания симптомов были разделены на две группы: группа А – пациенты с благоприятным течением заболевания и группа Б – пациенты с неблагоприятным течением заболевания. При изучении распределения частот генотипов в зависимости от характера течения ХСН (таблица 3) оказалось, что в группе Б генотип Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp встречался достоверно чаще, по сравнению с группой А – 75,7 % и 43,2 % соответственно ($p < 0,05$); генотип Glu/Asp достоверно чаще встречался в группе А по сравнению с группой Б – 43,2 % и 22,9 % соответственно ($p < 0,05$).

У 96 больных исследована сосудодвигательная функция эндотелия по описанной выше методике. В связи с небольшим количеством пациентов с генотипами Asp/Asp полиморфного локуса Glu298Asp и 4a/4a полиморфного локуса NOS-VNTR эти больные были объединены с пациентами, имеющими генотипы Glu/Asp и 4a/4b, соответственно. Показатели, характеризующие состояние сосудодвигательной функции эндотелия, приведены в таблице 4.

Среди пациентов с генотипом Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp реакция на стимул, вызывающий выделение фактора релаксации, существенно снижена по сравнению с реакцией на гиперемию у пациентов, имеющих аллель Asp – $4,5 \pm 1,6$ и $9,8 \pm 1,7$ соответственно ($p < 0,01$). При этом исходный Д ПА и ее реакция на нитроглицерин у пациентов с разными генотипами достоверно не различались.

Обсуждение

В настоящее время описаны и исследованы 4 полиморфных локуса гена эндотелиальной NOS: аминокислотная замена Glu298Asp, нуклеотидная замена G10T в интроне 23, нуклеотидная замена A27C в интроне 18 и описанный диаллельный полиморфизм по числу tandemных повторов в 4 интроне гена eNOS-4a/4b полиморфизм [8].

Для настоящей работы выбраны два наиболее изученных полиморфных локуса гена eNOS: однонуклеотидная замена G/T в позиции 894 гена eNOS (экзон 7), которая приводит к полиморфизму на уровне аминокислотной последовательности Glu298Asp; VNTR-локус в интроне 4, который представлен двумя аллелями – 4b и 4a. Эндотелиальная NO-синтаза с Asp в 298 положении является объектом селективного протеолиза в клетках эндотелия, в результате чего нарушается ее ферментативная активность, приводя к снижению продукции NO [9,10]. В ряде исследований было показано, что 4a/4a-генотипу полиморфного локуса NOS-VNTR соответствует максимальный уровень базального NO, у людей с 4b/4b-генотипом уровень NO приблизительно в 2 раза ниже, гетерозиготы занимают промежуточное положение [8,11]. В европейской популяции 4b аллель встречается гораздо чаще, чем аллель 4a [4].

В литературе данных о связи полиморфных локусов гена eNOS с ЭД относительно мало, а информация о связи этих полиморфизмов с риском развития и характером прогрессирования ХСН у больных ИБС и АГ отсутствует. В одной работе

Таблица 3

Распределение частот генотипов в зависимости от характера течения ХСН

Генотип	Группа А (n=95)	Группа Б (n=70)	p
Glu/Glu	41 (43,2 %)	53 (75,7 %)	<0,05
Glu/Asp	41 (43,2 %)	16 (22,9 %)	<0,05
Asp/Asp	13 (13,6 %)	1 (1,4 %)	нд
4a/4a	2 (2,1 %)	2 (2,9 %)	нд
4a/4b	27 (28,4 %)	29 (41,4 %)	нд
4b/4b	66 (69,5 %)	39 (55,7 %)	нд

Примечание: нд – недостоверно.

Результаты анализа сосудодвигательной функции эндотелия в зависимости от генотипов

Показатель	Генотип Glu/Glu (n=45)	Генотип Glu/Asp+Asp/Asp (n=51)	Генотип 4a/4a + 4a/4b (n=39)	Генотип 4b/4b (n=57)
Исходный Д ПА, см	0,345±0,008	0,332±0,015	0,337±0,012	0,335±0,010
Реакция на гиперемию, %	4,5±1,6*	9,8±1,7	6,7 ±1,7	8,2±1,9
Реакция на нитроглицерин, см	0,036±0,004	0,042±0,005	0,032±0,005	0,039±0,005

Примечание: * - достоверное различие с генотипами Glu/Asp+Asp/Asp (p<0,01).

установлена ассоциация 4a аллеля полиморфного локуса NOS-VNTR с признаками сосудодвигательной ЭД – спазмом коронарных артерий в ответ на введение ацетилхолина, а также с достоверно более низкой реакцией на введение нитратов [12]. Однако в другом исследовании отсутствовала связь между VNTR (4a/4b) и Glu298Asp полиморфными локусами гена eNOS и ЭД у мужчин с АГ [13]. Есть работы, в которых не были обнаружены достоверные различия в распределении частот аллелей 4a и 4b полиморфного локуса NOS-VNTR у больных АГ и у больных с коронарным атеросклерозом по сравнению со здоровыми людьми [14,15]. В настоящей работе также отсутствовала связь между VNTR (4a/4b) полиморфным локусом гена eNOS и сосудодвигательной ЭД, но была получена ассоциация Glu/Glu-генотипа полиморфного локуса Glu298Asp гена eNOS с данным нарушением функции эндотелия.

При изучении полиморфного локуса Glu298Asp гена eNOS была показана ассоциация с вазоспастической стенокардией, а также большая распространенность (2%) у больных инфарктом миокарда (ИМ), в то время как, у здоровых лиц этот аллель практически отсутствовал [16]. В европейской популяции также обнаруживают ассоциацию данного аллеля с риском развития ИМ, хотя общая частота распространения аллеля 298Asp выше: до 10% у здоровых и до 36% у больных острым ИМ [17]. В другом исследовании вариант Asp298 (Т аллель), был связан с более плохим прогнозом у пациентов с ХСН, вызванной систолической дисфункцией, особенно у пациентов с неишемической кардиомиопатией [18]. С другой стороны существуют данные об ассоциации аллеля Glu298 с развитием преэклампсии и АГ [19–21]. В этом исследовании Glu/Glu генотип полиморфного локуса Glu298Asp

также был ассоциирован с более тяжелым и неблагоприятным течением ХСН у больных ИБС и АГ. Характерно, что данные об ассоциации аллеля Glu298 с развитием ЭД можно встретить в статьях, в которых исследовались китайская и российская популяции, в то время как данные об ассоциации аллеля Asp298 получены на европеоидных популяциях. Возможно, для полиморфного локуса Glu298Asp есть различия в популяционных особенностях частоты распространения и генетическом вкладе данных аллелей в развитие заболевания.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено, что генотип Glu/Glu полиморфного локуса Glu298Asp гена eNOS встречается достоверно чаще в ОГ среди пациентов с ХСН, чем в ГК, что свидетельствует о важной роли изменений метаболизма NO в развитии ХСН. Повышенная частота распространения этого генотипа соответствовала более высокому ФК ХСН, а также ассоциировалась с неблагоприятным, рефрактерным клиническим течением заболевания. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии определенной генетической предрасположенности к развитию и прогрессированию ХСН, что открывает перспективы к раннему выявлению групп повышенного риска развития ХСН в общей популяции, а также к разработке более дифференцированных схем лечения и профилактики, механизмов более точного прогнозирования течения заболевания. Требуется дальнейшего изучения взаимосвязь исследуемого генотипа с выявленными признаками ЭД, что, возможно, ведет к уточнению конкретных патогенетических механизмов формирования и прогрессирования ХСН.

Литература

1. Баранов В.С. Программа "Геном человека как научная основа профилактической медицины". Вестник РАМН 2000; 10: 27–37.
2. Баранов И.С., Баранова Е.В., Ивашенко Т.Э. и др. Геном человека и гены "предрасположенности" (Введение в предиктивную медицину). Санкт-Петербург "Интермедика" 2000; 271 с.
3. Le Convoisier P, Park HY, Carlson KM, et al. Impact of genetic polymorphisms on heart failure prognosis. Arch Mal Coeur Vaiss 2003; 96(3): 197–206.
4. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Mol Genet Metab 2000; 70: 241–51.
5. Минушкина Л.О., Затеишиков Д.А., Сидоренко Б.А. Генетические аспекты регуляции эндотелиальной функции при артериальной гипертензии. Кардиология 2000; 3: 68–76.
6. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992; 340: 1111–5.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Москва "Мир" 1984; 480 с.
8. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3147–53.
9. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 2832–5.
10. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, et al. Modifier effect of eNOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. Hum Mol Genet 2002; 11: 229–41.
11. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 1993; 268: 17478–88.
12. Britten MB, Schachinger V, Dimmeler S, et al. eNOS-polymorphism is associated with coronary endothelial dysfunction. Eur Heart J 1999; 20: Abstract 907 (Suppl 144).
13. Dell'Omo G, Penno G, Pucci L, et al. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, microalbuminuria and endothelial dysfunction in hypertensive men. J Hypertens 2007; 25: 1389–95.
14. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. Hypertension 1998; 32: 3–8.
15. Степанов В.А., Спиридонова М.Г., Пузырев В.П. и др. Генетический полиморфизм аполипопротеина А1, ангиотензин-конвертирующего фермента и эндотелиальной синтазы окиси азота у больных коронарным атеросклерозом. Бюлл экспер биол мед 1999; 127: 96–7.
16. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial Nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. Hypertension 1998; 32: 521–6.
17. Hingorani A, Fan Liang C, Fatibene J, et al. An acidic amino acid substitution in the putative arginine binding domain of endothelial nitric oxide synthase is a major risk factor for ischaemic heart disease. XIX Congress of the European society of Cardiology 1997; Abstr: 3279.
18. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. Circulation 2003; 107(12): 1598–602.
19. Chen LK, Huang CH, Yeh HM, et al. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene may be protective against pre-eclampsia in a Chinese population. Reprod Sci 2007; 14(2): 175–81.
20. Kim JS, Cho JR, Park S, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism is associated with hypertensive response to exercise in well-controlled hypertensive patients. Yonsei Med J 2007; 48(3): 389–95.
21. Минушкина Л.О., Затеишиков Д.А., Затеишикова А.А. и др. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы и гипертрофия миокарда у больных артериальной гипертензией. Кардиология 2002; 3: 30–4.

Поступила 07/12–2007