

УДК 616.12:575.113.2+577.152.1

В.Е. ДОСЕНКО¹, Я.М. ЛУТАЙ², В.Ю. ЗАГОРИЙ¹,
А.Н. ПАРХОМЕНКО², А.А. МОЙБЕНКО¹

¹Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

²Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины, Киев

E-mail: dosenko@prontomail.com

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ В УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ



Представлены результаты определения аллельного полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) у 221 больного с острым коронарным синдромом и 83 здоровых индивидуумов. Установлено, что соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и патологических гомозигот при анализе $T^{786} \rightarrow C$ полиморфизма промотора составляет 48, 36, 16 % соответственно (в контроле — 48, 46, 6%; $P < 0,05$ по χ^2 -критерию); при анализе $G^{894} \rightarrow T$ полиморфизма 7-го экзона — 34, 58, 8 % (в контроле — 29, 67, 4%; $P > 0,05$), а при определении 4a/4b полиморфизма 4-го интрона — 64,5, 31, 4,5 % (в контроле — 62,5; 32,5; 5%; $P > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что C/C вариант промотора гена *eNOS* имеет отношение к увеличению вероятности развития остального коронарного синдрома в украинской популяции.

© В.Е. ДОСЕНКО, Я.М. ЛУТАЙ, В.Ю. ЗАГОРИЙ,
А.Н. ПАРХОМЕНКО, А.А. МОЙБЕНКО, 2005

Введение. Широко известно, что угнетение активности эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) является одним из ведущих механизмов развития атеросклероза и его проявлений — ишемической болезни сердца (ИБС), нарушений мозгового кровообращения и нарушений циркуляции крови в различных органах (нижние конечности, легкие, почки, половые органы и т.д.) [1—3]. Новый стимул в исследованиях патогенетической роли *eNOS* дали возможности генетического анализа, а именно выяснение последовательности нуклеотидов в гене *eNOS* и установление ряда аллельных вариантов генетического полиморфизма этого гена [1, 4—7]. На сегодняшний день описано 14 вариантов полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP) промотора, экзонов, инtronов, а также tandemные повторы вариабельного количества (VNTR) в 4-м интроне. Крупномасштабные популяционные исследования, проведенные в различных регионах мира, четко указывают на взаимосвязь между наличием аллельного полиморфизма промотора, 7-го экзона, а также 4-го интрана и склонностью к ишемической болезни сердца [8—18]. Опубликованные в марте 2004 г. результаты мета-анализа исследований, проведенных в 26 генетических центрах, позволили сделать вывод о том, что факторами риска ИБС являются замена $G^{894} \rightarrow T$ в 7-м экзоне, приводящая к замене глутамина на аспарагин в 298-м положении оксигеназного домена белка *eNOS*, и инсерционно-делециональный полиморфизм в 4-м интране (4a/4b полиморфизм) [19]. При этом не было получено достоверных данных о роли полиморфизма промотора ($T^{786} \rightarrow C$). Однако именно этот вариант полиморфизма промотора влияет на уровень экспрессии гена [5]. Замена же глутамина на аспарагин, скорее всего, не влияет на способность фермента генерировать NO [20], а о механизмах влияния наличия или отсутствия 27 пар нуклеотидов в 4-м интране почти ничего не известно.

Исследование роли генетических факторов в патогенезе остального коронарного синдрома (ОКС) как одного из вариантов ИБС было посвящено всего несколько работ. В 2004 г. корейской группой исследователей удалось показать, что наиболее значимым аллельным вариантом при развитии этой формы ИБС является полиморфизм 4-го интрана, а полиморфизм 7-го экзона практически не имеет значения [21]. Парадоксальность ситуации заключается в том, что именно патологический (по данным практических

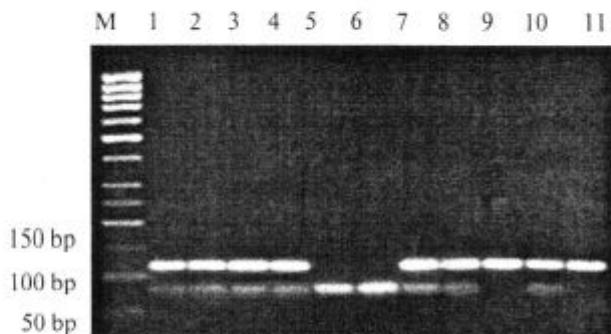


Рис. 1. Результаты электрофореза фрагмента промотора гена эндотелиальной NO-синтазы после рестрикции с использованием фермента PdI: M — маркер молекулярной массы (bp — пары нуклеиновых оснований), дорожки 1—4, 7, 8, 10 соответствуют T/C-генотипу, 5, 6 — патологическому C/C-генотипу, 9 и 11 — нормальному T/T-генотипу

исследователей данной проблемы) вариант интрона (4a/4a) имеет протективное значение в развитии ОКС [1, 6, 16, 22, 23]. Такая неоднозначность литературных данных натолкнула нас на необходимость проведения исследования в украинской популяции на предмет наличия взаимосвязи между алельными вариантами промотора, экзона и интрона гена eNOS и вероятностью развития, а также клиническим течением ОКС.

Материалы и методы. В основу настоящей работы положены результаты обследования 221 больного с острым коронарным синдромом (81,7 % мужчин и 18,3 % женщин) в возрасте от 40 до 83 лет (средний возраст $58,5 \pm 0,7$ года), госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии Института кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины. Заключительный диагноз нестабильной стенокардии (НС) поставлен 33,5 % больных, острого инфаркта миокарда (ИМ) — 66,5 % больных. Диагноз острого ИМ и НС устанавливали на основании данных клинических, электрокардиографических и биохимических обследований, согласно рекомендациям экспертов ВОЗ, а также в соответствии с рекомендациями европейского и американского обществ кардиологов [24—26]. Контрольную группу составили 83 практически здоровых донора, у которых отсутствие сердечно-сосудистой патологии подтверждали путем сбора анамнестических данных, снятия электрокардиограммы и измерения артериального давления. Контрольная группа и группа больных не отличались по воз-

расту и соотношению полов, $P > 0,05$ по χ^2 -критерию.

Для генотипирования венозную кровь забирали в стерильных условиях в моноветты объемом 2,7 мл с калиевой солью этилендиаминететрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Германия), замораживали и сохраняли при температуре при -20°C . ДНК выделяли из цельной крови с использованием наборов Изоген (Россия). Методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов определяли $T^{786} \rightarrow C$ полиморфизм промотора по Ghilardi et al. [9] с модификациями. Для этого амплифицировали участок промотора указанного гена с помощью пары специфических праймеров: прямой (sense) — 5'-CAC CTG CAT TCT GGG AAC TGT A-3' и обратный (antisense) — 5'-GCC GCA GTA GCA GAG AGAC-3'. Праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Для амплификации брали 50—100 нг ДНК и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл пятикратного PCR-буфера, 1,5 mM сульфата магния, 200 мКМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 20 пМ каждого из праймеров и 0,5 ед. Тац-полимеразы («Ампли-Сенс», Россия), объем доводили до 25 мкл дениннизионированной водой. PCR проводили в термопараллеле «GeneAmp System 2700» («Applied Biosystems», США). Амплификация фрагмента промотора состояла из 35 циклов: денатурация — 94°C (1 мин), отжиг праймеров — 63°C (50 с) и элонгация — 74°C (1 мин). В дальнейшем 6 мкл продукта амплификации фрагмента промотора инкубировали при 37°C в течение 18 ч с 5 ед. рестриктазы PdI («Ферментас», Литва) в буфере Y⁺/Tango следующего состава: 33 mM трикс-ацетата (рН 7,9), 10 mM ацетата магния, 66 mM ацетата калия, 0,1 мг/мл альбумина. Наличие в T^{786} положении промотора тимидина препятствует рестрикции, а при замене на цитозин PdI расщепляет амплифицированный участок промотора (размер 125 пар оснований) на два фрагмента — 95 и 30 пар оснований (рис. 1). Алельный полиморфизм 7-го экзона гена eNOS ($G^{894} \rightarrow T$ полиморфизм) определяли также путем амплификации фрагмента и последующей рестрикции [4]. Последовательность нуклеотидов в специфических праймерах была следующей: прямой (sense) — 5'-TCC CTG AGG AGG GCA GGC-3' и обратный (antisense) — 5'-TGA GGG

TCA SAC AGG TTC CT-3'. Для амплификации брали 50–100 нг ДНК и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл пятикратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфата магния, 200 мКМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 20 пМ каждого из праймеров и 0,5 ед. Тақ-полимеразы («АмплиСенс», Россия), объем доводили до 25 мкл десионизированной водой. Амплификация фрагмента 7-го экзона состояла из 35 циклов: денатурация – 94 °C, 1 мин, отжиг праймеров – 64 °C, 1 мин и элонгация – 74 °C, 1 мин. Для определения SNP 7-го экзона 6–10 мкл продукта амплификации инкубировали при 37 °C в течение 20 ч с 8 ед. рестриктазы Eco24I («Ферментас», Литва) в буфере Y⁺/Tango следующего состава: 33 мМ трис-ацетата (рН 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, 0,1 мг/мл альбумина или рестриктазы 5 ед. MboI в буфере R⁺ следующего состава: 10 мМ трис-ацетата (рН 8,5), 10 мМ хлорида магния, 100 мМ хлорида калия, 0,1 мг/мл альбумина. Если в положении 894 гена eNOS находился гуанидин, то амплификат, состоящий из 457 пар оснований, расщеплялся рестриктазой Eco24I на два фрагмента – 137 и 320 пар оснований. В случае замены G⁸⁹⁴→T сайт рестрикции для Eco24I теряется, а для рестриктазы MboI, наоборот, появляется, и образуются два фрагмента указанного размера (рис. 2).

Амплификаты фрагмента промотора и 7-го экзона после рестрикции разделяли в 2,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Визуализация ДНК после горизонтального электрофореза (160 В на протяжении 40 мин) проводилась с помощью трансиллюминатора («Биоком», Россия).

Для определения инсерционно-делеционального полиморфизма 4-го интрона гена eNOS использовали пару специфических праймеров: прямой (sense) – 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3' и обратный (antisense) – 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3' [23]. Программа амплификации была следующей: денатурация – 94 °C (1 мин), отжиг праймеров – 60 °C (1 мин) и элонгация – 74 °C (1 мин), всего 35 циклов. Полученные амплификаты разделяли в 2,5%-ном агарозном геле (155 В в течение 45 мин) в присутствии бромистого этидия.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программы Excel 2000. При этом достоверность отличий определяли по

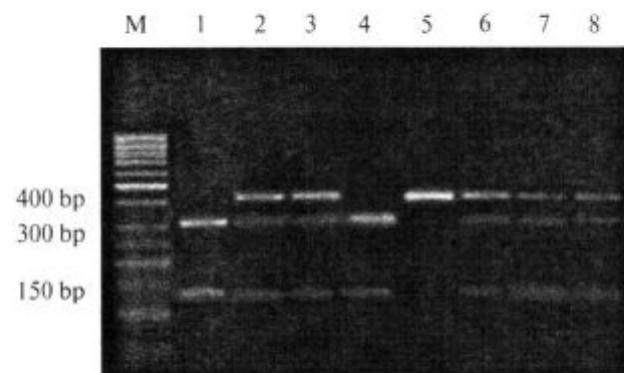


Рис. 2. Результаты электрофореза фрагмента 7-го экзона гена эндотелиальной NO-синтазы после рестрикции с использованием фермента Eco24I: М – маркер молекулярной массы (bp – пары нуклеиновых оснований), дорожки 2, 3, 6–8 соответствуют G/T-генотипу, 5 – патологическому T/T-генотипу, 1 и 4 –циальному G/G-генотипу

χ^2 -критерию. Значение Р < 0,05 считали достоверным.

Результаты исследований и их обсуждение. Генотипирование больных по трем сайтам эндотелиальной NO-синтазы и сравнение полученных данных с результатами рестрикционного анализа в контрольной группе позволило установить, что частота встречаемости определенных вариантов этого гена различна для промотора, экзона и интрана (рис. 3). Так, соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и патологических гомозигот при анализе T⁻⁷⁸⁶→C полиморфизма промотора составило 48, 36, 16 % соответственно (в контроле – 48, 46, 6 %; Р < 0,05 по χ^2 -критерию); при анализе G⁸⁹⁴→T полиморфизма 7-го экзона – 34, 58, 8 % (в контроле – 29, 67, 4 %; Р > 0,05), а при определении 4a/4b полиморфизма 4-го интрана – 64,5, 31, 4,5 % (в контроле – 62,5, 32,5, 5 %; Р > 0,05). Достоверные отличия при сравнении с контрольной группой были установлены только для полиморфизма промотора. В группе доноров патологический вариант С/С встречался в 2,7 раза реже, чем у больных с острым коронарным синдромом.

Аллельный полиморфизм 7-го экзона гена eNOS был особо привлекателен для исследователей данной проблемы, так как это единственный из известных вариантов полиморфизма, приводящий к замене одной аминокислоты в белке eNOS. Предполагалось, два варианта реализации патологического генотипа в данном случае – образование каталитически дефектно-

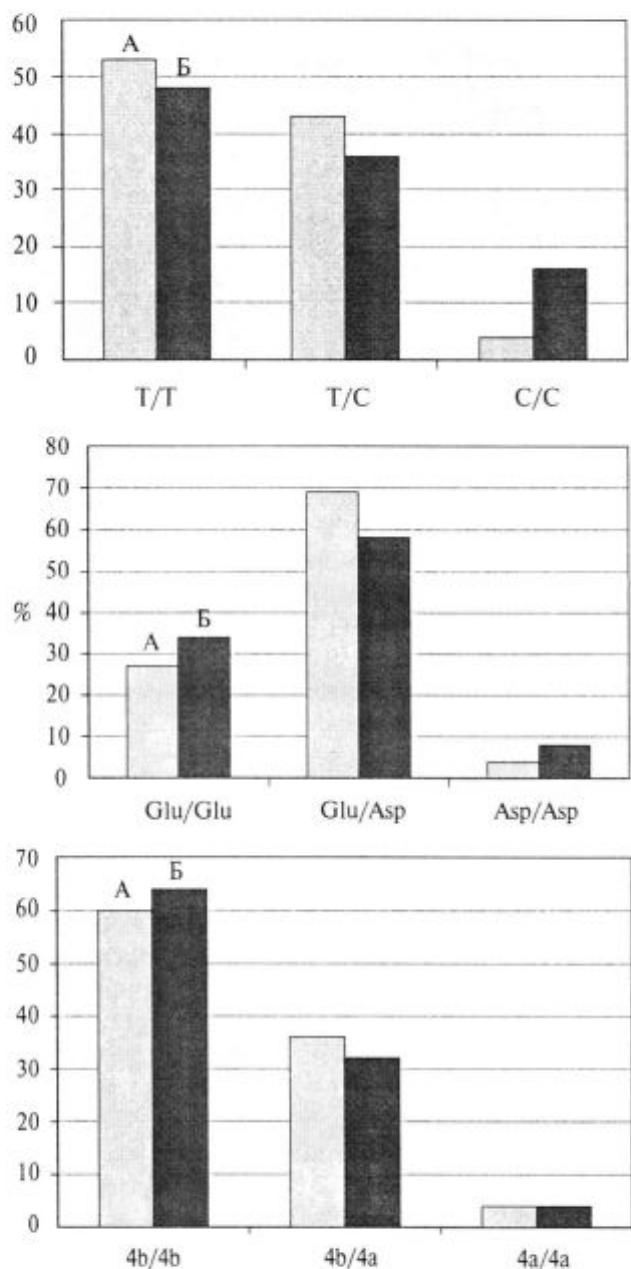


Рис. 3. Частота аллельных вариантов гена eNOS (по вертикали, %) у практически здоровых индивидуумов (A) и больных с острым коронарным синдромом (Б)

го белка или ускоренная деградация белка (возможно, за счет ускоренного протеасомального протеолиза) [1]. Относительно первого предположения иллюзии рассеялись достаточно быстро. В работе Golser et al. [20] было показано, что мутантный вариант белка (Asp/Asp) не уступает «дикому» варианту (Glu/Glu) ни по аффинности

к аргинину, ни по интенсивности образования цитруллина, оксидо-редуктазной активности, чувствительности к кальцию, кальмодулин-связывающей активности и другим свойствам. Аналогичные данные получили Song et al. [27]: количество матричной РНК и белка eNOS, а также активность фермента в культивированных эндотелиальных клетках не отличались у гетерозигот и гомозигот по $G^{894} \rightarrow T$ полиморфизму. Тем не менее большинство проведенных в мире генетических исследований указывают на взаимосвязь между этим вариантом полиморфизма и вероятностью развития сердечно-сосудистых заболеваний [7, 10, 14, 18, 19, 28]. Наши данные относятся к меньшей части работ, в которых эта взаимосвязь не была установлена [12, 29, 30]. Однако обращает на себя внимание тот факт, что гомозиготы с наличием патологического аллеля (Asp/Asp) в позиции 298 гена eNOS встречались в два раза реже в группе контроля, чем среди больных с ОКС, хотя эта разница и не достигла достоверных значений (8 % у больных с ОКС по сравнению с 4 % в контроле, $P > 0,05$).

Разноречивы данные исследований относительно патогенетического значения полиморфизма 4-го интрона гена eNOS. Как указывалось выше, корейские исследователи при определении частоты аллельных вариантов гена eNOS показали, что при наличии 4a варианта интрона вероятность развития ОКС значительно меньше, чем у носителей 4b-аллеля [21]. О возможном протективном эффекте редкого 4a варианта интрона указывается и работе Hassan et al. [31]. В этом исследовании установлено, что у больных с поражением мелких сосудов мозга этот вариант интрона встречается значительно реже, чем в контрольной группе. Более того, уровень нитратов в плазме крови (NO_3^-) значительно выше у людей с С/С-генотипом промотора в сочетании с 4a-аллелем интрона. Согласно нашим данным, в украинской популяции какой-либо связи между полиморфизмом 4-го интрона и вероятностью развития ОКС не наблюдается.

Трансверсия в промоторе ($T^{-786} \rightarrow C$) по данным проведенного в Японии исследования (174 пациента со спазмом коронарных сосудов и 161 контрольный субъект) значительно чаще встречается у больных с ИБС [13]. С использованием люциферазного теста была получена информация о функциональной активности различных

вариантов промотора гена eNOS [5]. Оказалось, что при трансверсии $T^{-786} \rightarrow C$ значительно уменьшается активность промотора, так как при введении в эндотелиальные клетки генетической конструкции, включавшей нормальный или патологический вариант промотора + вектор гена люциферазы, экспрессия люцеферазы была меньшей при $T^{-786} \rightarrow C$ замене в промоторе. При моделировании гипоксии на этих трансформированных клетках активность люциферазы возрастала при $T^{-786} \rightarrow C$ трансверсии в промоторе на 69 %, тогда как при нормальном варианте промотора — на 110 %. Эти данные могут быть непосредственно использованы при объяснении механизмов развития ишемической болезни сердца вообще и острого коронарного синдрома — в частности. При нарушении коронарного кровообращения у индивидуумов с патологическим вариантом промотора значительно в меньшей степени активируется транскрипция гена eNOS, образуется недостаточное количество белковых молекул eNOS, которого не хватает для выделения дополнительного количества NO. В результате этого сосуд расширяется в меньшей степени, адгезия и агрегация тромбоцитов не предотвращается и оказываются недостаточными другие механизмы ангио- и кардиопротекторного действия монооксида азота. Однако не следует забывать о том, что результаты опытов в условиях *in vitro* часто не совпадают с данными, полученными в реальных условиях. Например, в цитируемом выше исследовании Hassan et al. [31] показано, что именно у C/C гомозигот уровень нитратов в плазме крови выше, чем у людей с T/T-генотипом промотора гена eNOS. Связано ли это с повышением активности eNOS или с активацией индуцильной изоформы этого фермента неизвестно. Возможно, решение этой проблемы заключается в определении интенсивности продукции NO в клетках, изолированных из крови людей с известным генотипом.

SUMMARY. Endothelial NO-synthase (eNOS) gene allelic polymorphism in 221 patients with acute coronary syndrome and in 83 practically healthy people was determined. It was shown that interrelations of normal homozygotes, heterozygotes and pathologic homozygotes in T/C promoter polymorphism analysis account 48 %, 36 % and 16 % correspondingly (in control — 48 %, 46 %, 6 %; P < 0.05 by χ^2 -test); in G⁸⁹⁴→T polymorphism of exon 7 analysis — 34 %, 58 %, 8 % (in control — 29 %, 67 %, 4 %; P > 0.05), and in determination of

4a/4b polymorphism of intron 4 — 64,5 %, 31 % and 4,5 % (in control — 62,5 %, 32,5 %, 5 %; P > 0.05). Obtained data show that eNOS C/C promoter variant is a risk factor of acute coronary syndrome in Ukrainian population.

РЕЗЮМЕ. Наведено результати визначення алельного поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у 221 хворого на гострий коронарний синдром і 83 здорових індивідів. Встановлено, що співвідношення нормальніх гомозигот, гетерозигот і патологічних гомозигот при аналізі $T^{-786} \rightarrow C$ поліморфізма промотору складає 48, 36, 16 % відповідно (в контролі — 48, 46, 6 %; P < 0,05 за χ^2 -критерієм); при аналізі $G^{894} \rightarrow T$ поліморфізму 7-го екзону — 34, 58, 8 % (в контролі — 29, 67, 4 %; P > 0,05), а при визначенні 4a/4b поліморфізму 4-го інtronу — 64,5; 31; 4,5 % (в контролі — 62,5; 32,5; 5 %; P > 0,05). Отримані дані свідчать про те, що C/C варіант промотору гена eNOS має відношення до збільшення ймовірності розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Досенко В.Є., Загорій В.Ю., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. Патофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журн. — 2002. — **48**, № 6. — С. 86—102.
2. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. — 2001. — **357**. — P. 593—615.
3. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // Pharmacol. Rev. — 1991. — **43**. — P. 109—142.
4. Hibi K., Ishigami T., Tamura K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction // Hypertension. — 1998. — **32**, № 3. — P. 521—526.
5. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. $T^{-786} \rightarrow C$ Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // Circulation. — 1999. — **99**. — P. 2864—2870.
6. Wang X.L., Sim A.S., Wang M.X. et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity // FEBS Lett. — 2000. — **471**, № 1. — P. 45—50.
7. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene $T^{-786} \rightarrow C$ and missense Glu298Asp variants // J. Investig. Med. — 2000. — **48**, № 5. — P. 367—374.
8. Alvarez R., Gonzalez P., Batalla A. et al. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease // Nitric Oxide. — 2001. — **5**, № 4. — P. 343—348.
9. Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M. et al. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene // Clin. Chem. — 2002. — **48**, № 7. — P. 989—993.

10. Guzik T.J., Black E., West N.E. et al. Relationship between the G894T polymorphism (Glu298Asp variant) in endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated endothelial function in human atherosclerosis // Amer. J. Med. Genet. — 2001. — **100**, № 2. — P. 130—137.
11. Hingorani A.D., Liang C.F., Fatibene J. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK // Circulation. — 1999. — **100**, № 14. — P. 1515—1520.
12. Liyou N., Simons L., Friedlander Y. et al. Coronary artery disease is not associated with the E298→D variant of the constitutive, endothelial nitric oxide synthase gene // Clin. Genet. — 1998. — **54**, № 6. — P. 528—529.
13. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T¹⁷⁸⁹→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis // Amer. J. Cardiol. — 2000. — **86**, № 6. — P. 628—634.
14. Nassar B.A., Bevin L.D., Johnstone D.E. et al. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease // Amer. Heart J. — 2001. — **142**, № 4. — P. 586—589.
15. Park J.E., Lee W.H., Hwang T.H. et al. Aging affects the association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction in the Korean male population // Korean J. Intern. Med. — 2000. — **15**, № 1. — P. 65—70.
16. Tanus-Santos J.E., Desai M., Flockhart D.A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants // Pharmacogenetics. — 2001. — **11**, № 8. — P. 719—725.
17. Wang J., Dudley D., Wang X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2002. — **22**, № 5. — P. 1—4.
18. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese // Hum. Genet. — 1998. — **103**, № 1. — P. 65—69.
19. Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects // Circulation. — 2004. — **109**. — P. 1359—1365.
20. Golser R., Gorren A.C.F., Mayer B., Schmidt K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system // Nitric Oxide. — 2003. — **8**. — P. 7—14.
21. Park K.W., You K.H., Oh S. et al. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans // Heart. — 2004. — **90**. — P. 282—285.
22. Мустафина О.Е., Шагисултанова Е.И., Насибуллин Т.Р. и др. Микросателлитный полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы: исследования популяций Волго-Уральского региона и анализ связи с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией // Генетика. — 2001. — **37**, № 5. — С. 668—674.
23. Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene // Nat. Med. — 1996. — **2**, № 1. — P. 41—45.
24. Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K.A.A. et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J. — 2002. — **23**. — P. 1809—1840.
25. Braunwald E., Antman E.M., Brooks N.H. et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non ST-elevation myocardial infarction : Executive summary and Recommendations. A report of the American College of Cardiology / American Heart Association task force on practice guidelines (committee on management of patients with unstable angina) // Circulation. — 2000. — **102**. — P. 1193—1209.
26. World Health Organization. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease // Circulation. — 1979. — **59**. — P. 607—609.
27. Song J., Yoon Y., Park K.U. et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentration, and enzyme activity in cultured human endothelial cells // Clin. Chem. — 2003. — **49**, № 6. — P. 847—852.
28. Colombo M.G., Andreassi M.G., Paradossi U. et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298→Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease // Heart. — 2002. — **87**, № 6. — P. 525—528.
29. Granath B., Taylor R.R., van Bockxmeer F.M., Mamotte C.D. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population // J. Cardiovasc. Risk. — 2001. — **8**, № 4. — P. 235—241.
30. Wang C.L., Hsu L.A., Ko Y.S. et al. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese // J. Formos. Med. Assoc. — 2001. — **100**, № 11. — P. 736—740.
31. Hassan A., Gormley K., O'Sullivan M. et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease // Stroke. — 2004. — **35**. — P. 654—659.

Поступила 20.10.04