

УДК 612.1.014.49:546.172.6

Н.А. КРАВЧЕНКО¹, Н.В. ЯРМЫШ²

¹ Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины, Харьков

² Харьковский государственный медицинский университет
E-mail: gdt-therapy@mail.ru

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ И ДИСФУНКЦИЯ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ



Оксид азота (NO) образуется из L-аргинина с помощью эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). NO участвует в регулировании физиологически важных функций сердечно-сосудистой (регулирует сокращение сердца, клеточную пролиферацию, тонус сосудов и давление крови), иммунной и нервной систем. Синтез NO изменяется в ответ на факторы воспаления, гипоксию, липиды и др. Интенсивность транскрипции гена eNOS зависит от полиморфных аллелей гена eNOS и посттранскрипционных механизмов, обеспечивающих стабильность мРНК. Все эти факторы влияют на развитие кардио-васкулярных событий.

© Н.А. КРАВЧЕНКО, Н.В. ЯРМЫШ, 2008

Введение. Предположение о существовании эндотелий-зависимого фактора релаксации, который в 1980 г. был идентифицирован Furchgott et al. [1] как оксид азота (NO), трансформировало наше понимание роли эндотелиальных клеток в регуляции функции сердечно-сосудистой системы. Это открытие определило интерес к сосудистой эндотелиальной функции и предопределило в середине 80-х гг. прошлого столетия развитие нового направления — эндотелиальная дисфункция как основной фактор патогенеза сосудов, что, в свою очередь, ускорило развитие новой терапевтической стратегии [2].

NO обладает широким спектром биологического действия: участвует в работе центральной и вегетативной нервной системы, в функционировании желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы, в деятельности секреторных тканей и органов дыхания, в регуляции сердечно-сосудистой системы. При высоких концентрациях NO может проявлять цитостатическую и/или цитотоксическую активность, что указывает на его роль в системе клеточного иммунитета. Эта функция определяет влияние NO на процессы инициирования и протекания апоптоза [3].

Синтез NO из L-аргинина осуществляется под действием трех основных изоформ фермента NO-синтаз (NOS): нейрональной (nNOS), эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS). В активной форме все три изоформы представляют собой гомодимеры с молекулярной массой 130 (iNOS), 135 (eNOS) и 160 (nNOS) кДа [3,4]. В мономере фермента NOS, начиная с C-конца, выделяют: 1) редуктазный домен, сходный по аминокислотному составу с цитохром P-450-редуктазой; 2) малый кальмодулин-связывающий домен; 3) оксигеназный домен с характеристиками, подобными цитохрому P-450, но без структурной гомологии; 4) N-концевую специфическую последовательность [4].

Для функционирования NOS требуется пять различных простетических групп и кофакторов. Редуктазный домен содержит две флавиновые половины — ФАД и ФМН. ФАД является первичным акцептором электронов, происходящих от НАДФН, тогда как ФМН переносит электроны от ФАД в центр гема на оксигеназный домен. Последний содержит центры связывания для гема, субстрата L-ар-

гина и кофактора (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерина (BH₄) [4, 5].

Образование NO регулируется через изменение экспрессии либо активности самого фермента eNOS, либо вследствие изменения активности кофакторов или эндогенных ингибиторов. NO эндотелиального происхождения является важным атеропротекторным медиатором, и нарушение регуляции его синтеза сопряжено с повышением риска сердечно-сосудистых заболеваний. Токозависимая вазодилатация плечевой артерии, которая в значительной степени зависит от образования NO, нарушена у молодых здоровых лиц, состоящих в первой степени родства с умершими от ишемической болезни сердца (ИБС) до 55-летнего возраста, по сравнению с лицами контрольной группы (без семейной истории ИБС), сопоставимой по возрасту [6–10]. У линии мышей NOS^{-/-} развивается гипертензия, а у линии, сочетающей в геноме отсутствие функционирующего гена аполипопротеина E и гена NOS, — атеросклероз. В связи с этим процессы регуляции синтеза NO и ген, кодирующий NOS, являются первоочередными кандидатами при исследовании эндотелиальной дисфункции сосудов и ряда сердечно-сосудистых заболеваний [11].

Таким образом, NOS следует рассматривать как сложный ферментный комплекс, синтезирующий высокоактивные соединения в зависимости от функционального состояния клетки.

Роль NO в регуляции сосудистого гомеостаза

Нормальный сосудистый эндотелий осуществляет атеропротективные действия посредством вазоактивных медиаторов, таких как NO, простагландин и фактор деполяризации эндотелиального происхождения (EDHF). С возрастом эндотелий подвергается разрушительному воздействию повышенного кровяного давления и увеличенных концентраций холестерина, глюкозы, гомоцистеина, продуктов воспалительной реакции и компонентов табачного дыма [7]. Эндотелиальная дисфункция может быть обнаружена в плечевой или коронарной артериях *in vivo* до развития клинического атеросклероза в виде нарушения вазодилатации. Эндотелиальная дисфункция, опре-

деленная этим методом, коррелирует с другими общепризнанными факторами риска сердечно-сосудистых осложнений и может быть использована как прогностический критерий [12, 13]. В сосудистом эндотелии NO представляет собой короткоживущий вазоактивный субстрат (не более 1 с), который играет ключевую роль в релаксации и снижении миграции и пролиферации сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК), ингибировании адгезии тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, ингибировании окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [4, 5, 12]. NO может ингибировать многие ключевые звенья атерогенеза. Изменение продукции NO в сосудистом эндотелии отвечает за патогенез атеросклероза (АС). В связи с этим функциональные варианты гена eNOS влияют на индивидуальную предрасположенность к АС [7, 14].

Другими исследованиями продемонстрировано, что eNOS в клетках эндотелия повышает продукцию NO и цГМФ в ГМК, снижая эффект вазоконстрикции, вызванный фенилэфрином, и обеспечивает эндотелий-зависимую релаксацию в ответ на ацетилхолин. В дальнейшем эксперименты, проведенные на нормальных артериях, были продолжены при различных патологических состояниях (гиперхолестеринемия, диабет). Установлено, что недостаток или ускоренный распад NO приводят к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с нарушением функции эндотелия, повышением тонуса сосудов и артериального давления (гипертензия, стенокардия, АС, диабетическая ангиопатия и др.) [3, 14, 15].

Индивидуальные различия в эндотелиальной функции и более позднее развитие АС могут быть связаны не только с различными уровнями экспозиции факторов риска, но также и с индивидуальными особенностями в экспрессии различных аллелей генов риска в сосудистом эндотелии. Внимание к изучению полиморфизма генов, отвечающих за синтез NO, обусловлено атеропротективными свойствами этого эндотелиального медиатора.

Регуляция транскрипции гена eNOS и стабильность мРНК

Ген eNOS находится в хромосоме 7q35–36 и содержит 26 экзонов. Матричная РНК гена

eNOS кодируется 4052 нуклеотидами. Последовательности в 5'-фланкирующем участке гена представлены многочисленными потенциальными цис-регуляторными последовательностями ДНК: Sp1, GATA, AP-1, NF-1, элементом, ответственным за напряжение сдвига (shear stress), и элементом, ответственным за регуляцию стеролом [16–20].

Прогресс в понимании молекулярных механизмов, вовлеченных в конститутивную и регулируемую экспрессию мРНК гена eNOS, обеспечен новым подходом к изучению эндотелиальной генной регуляции в норме и при патологии. Исследования проводятся в направлении выяснения механизмов транскрипции и стабильности мРНК гена eNOS – двух процессов, обеспечивающих уровень eNOS в сосудистом эндотелии. Конститутивная экспрессия eNOS зависит от уровня транскрипции промоторной области, включая позитивную и негативную регуляцию, взаимодействия белок–белок и белок–ДНК, эпигенетические события, такие как регуляторная экспрессия eNOS на посттранскрипционном уровне. Конститутивная активность является важным фактором, поддерживающим уровень eNOS, но различные физиологические и патофизиологические стимулы, изменяющие уровень транскрипции гена, играют немаловажную роль в нарушении продукции eNOS и NO. Например, повышение уровня транскрипции мРНК гена eNOS происходит в ответ на лизофосфатидилхолин (ЛФХ), на напряжение сдвига (shear stress) и в ответ на трансформирующий фактор роста бета (ТФР-бета) и др. [8, 16, 20–24]. При обычных условиях мРНК гена eNOS остается достаточно стабильной. Транскрипционный механизм в отдельных случаях является критически важным регуляторным путем в снижении экспрессии eNOS. При исследовании стабильности мРНК гена eNOS, которая в значительной степени определяет уровень и активность eNOS, были получены важные результаты, которые определили новое направление в изучении регуляции гена при патологии. Важно подчеркнуть, что стабильность мРНК гена eNOS может в значительной степени изменяться в зависимости от целого ряда факторов. В то же время дестабилизация мРНК гена eNOS играет значитель-

ную роль в быстром снижении уровня ее экспрессии в моделях воспаления, пролиферации/повреждения, окисления ЛПНП и при гипоксии. Период полужизни мРНК гена eNOS составляет от 24 до 48 ч. Стабильность транскриптов eNOS в значительной степени зависит от структуры 3'-нетранслируемой области гена [7, 14, 15]. После стимуляции клетки различными индукторами период полужизни мРНК может резко сокращаться, что при неизменном уровне транскрипции влияет на концентрацию мРНК гена eNOS.

Экзогенные и эндогенные индукторы eNOS

Напряжение сдвига. Роль нарушения тока крови при АС достаточно хорошо изучена, но тем не менее эффект изменения кровотока на экспрессию eNOS остается в центре внимания. Локальная NO-зависимая регуляция тонуса кровеносных сосудов осуществляется главным образом путем опосредования напряжения сдвига (shear stress). Исследование роли эндотелия на моделях животных при изменении кровотока и вазодилатации показали повышение экспрессии eNOS. Изменение уровня фермента было связано с индукцией экспрессии мРНК гена eNOS через транскрипционный путь. В то же время мыши линии eNOS^{-/-} не способны к ремоделированию сосудов в ответ на напряжение сдвига, который зависит от ядерного фактора каппаВ (NF-κB) [20]. За индуцированную транскрипционную активность напряжения сдвига в фетальных эндотелиальных клетках отвечает элемент AP-1 (-661), что свидетельствует о регуляции eNOS различными путями в натальном и постнатальном периодах [22].

Факторы роста. Представители суперсемейства ТФР-бета играют ключевую роль в регуляции роста и развития. В частности, ТФР-бета1 является важным медиатором в процессах сосудистого иммуноповреждения, ремоделирования сосудов, васкулогенеза и ангиогенеза. Как показано на культуре эндотелиальных клеток, ТФР-бета1 дозозависимым способом повышает уровень экспрессии мРНК гена eNOS и трансактивирует промотор гена eNOS посредством рибонуклеопротеиновых комплексов, содержащих сайты Smad и NF-1 [24].

Роль эндотелиального фактора роста сосудов (ЭФРС) в развитии кровеносных сосудов, биологии эндотелия и сосудистых заболеваний остается малоизученной. Для исследователей представляет интерес связь между ЭФРС и соотношением eNOS/NO. Bouloumie et al. [25] показали, что в культуре эндотелиальных клеток ЭФРС времязависимым и дозозависимым способами увеличивает экспрессию мРНК гена eNOS. Механизм, которым ЭФРС усиливает экспрессию мРНК гена eNOS, ожидает подтверждения.

Циклоспорин А. Применение циклоспорина А при иммуносупрессорной терапии, как выяснилось, сопровождается гипертензией. Этот гипертензивный эффект связывают с паракринной вазоконстрикцией. В то же время было установлено, что циклоспорин А также вызывает существенное повышение продукции NO *in vivo* и *in vitro*. Преинкубация культуры эндотелиальных клеток с циклоспорином А приводит к повышению экспрессии NO путем стимулирования транскрипции гена eNOS. Предполагают, что этот эффект циклоспорина обусловлен такими реактивными формами кислорода, как гидроперекиси. Реактивный кислород индуцирует активность элемента AP-1 промоторной области гена [26]. Перекись водорода активирует eNOS через механизмы, зависящие от Jak2, кальмодулин-киназы II и элемента промоторной области гена Sp-1 [27–29].

Липиды, липополисахариды и цитокины. Нарушение липидного обмена (дислипидопротеидемия) является существенным фактором риска развития атеросклероза. В исследованиях, проведенных на культуре эндотелиальных клеток, Liao et al. [30] впервые обнаружили, что окисленные ЛПНП вызывают зависимое от времени и дозы снижение конститутивного уровня мРНК гена eNOS и активности фермента. Этот эффект был обусловлен уменьшением периода полужизни мРНК гена eNOS с 36 до 10 ч. Очень высокий уровень нативных ЛПНП снижал экспрессию мРНК гена eNOS [21]. В культуре эндотелиальных клеток ЛФХ (основной компонент окисленных ЛПНП) мог повышать уровень мРНК гена eNOS. Возможно, этим объясняется двухфазный эффект различных доз окисленных ЛПНП на продукцию NO. ЛФХ повышает eNOS на уровне регуля-

ции транскрипции, и эта регуляция связана с сайтами Sp-1 и Ets [23, 30–32].

Липополисахариды (ЛПС) как сами по себе, так и в комплексе с цитокинами индуцируют существенное снижение уровня мРНК гена eNOS [30]. Обработка культуры эндотелиальных клеток ЛПС и актиномицином D снижает уровень мРНК гена eNOS в большей степени по сравнению с эффектом только одного актиномицина D. Некоторыми исследователями показано, что клеточный ответ синтеза eNOS на ЛПС связан со стабильностью мРНК и осуществляется в два этапа. На самом деле эффект фактора некроза опухоли – альфа (ФНО- α) и ЛПС на экспрессию eNOS и общую регуляцию при сепсисе, полученный экспериментально, в условиях *in vivo* является еще более сложным [31]. При AC основной медиатор воспаления ФНО- α снижает эндотелий-зависимую вазорелаксацию. Этот процесс опосредован снижением базального уровня мРНК гена eNOS. ФНО- α снижает период полужизни мРНК с 48 до 3 ч. Молекулярные механизмы, обуславливающие этот эффект, длительное время не удавалось выяснить. Инкубация клеток с ФНО- α повышала формирование рибонуклеопротеиновых комплексов в 3'-нетранслируемом участке гена eNOS [33]. Формирование этих комплексов отрицательно коррелировало с уровнем мРНК гена eNOS. Рибонуклеопротеиновый комплекс взаимодействует с различными вариантами гипервариабельной области мРНК гена eNOS, что обеспечивает стабильность базальных транскриптов eNOS и определяет ответ на различные стимулы [34–38].

Гипоксия. Молекулярные основы вазодилатации в ответ на гипоксию до конца не выяснены. К возможным механизмам относятся непосредственная релаксация ГМК сосудов в ответ на изменения pH, проводимость ионных каналов или снижение уровня АТФ. Эндотелиальные клетки в ответ на гипоксию также снижают экспрессию таких вазоконстрикторов, как эндотелин или тромбоксан, и усиливают высвобождение вазодилаторов, таких как аденозин, простаглицлин, фактор EDHF и NO [39]. Описаны различные эффекты гипоксии на экспрессию мРНК гена eNOS и синтез NO в эндотелиальных клетках. Гипок-

сию связывают с двумя эффектами — со снижением и повышением уровня экспрессии мРНК гена eNOS. Arnet et al. [39] установили, что гипоксия индуцирует повышение мРНК гена eNOS в культуре эндотелиальных клеток, которое было обусловлено увеличением транскрипционной активности гена. Coulet et al. [40] констатировали двухфазный ответ уровня мРНК гена eNOS в клетках эндотелия. Начальное повышение мРНК было результатом индукции транскрипции, связанной с гипоксизависимым энхансерным элементом, содержащим два сайта связывания [40]. Противоречивые результаты объясняются, в частности, неадекватностью условий экспериментов, которые заключаются в разной степени гипоксии, отличии типов клеток, несоответствии моделей. Приведенные доказательства свидетельствуют о том, что NO может модулировать экспрессию мРНК различных изоформ NOS, включая и собственно eNOS. Возможно, что различные модели *in vivo* и *in vitro* могут отражать отличия в регуляторных механизмах по типу обратной связи. В эксперименте и клинике для лечения сердечно-сосудистых заболеваний часто используется адаптация к гипоксии. Было установлено, что тяжелая или хроническая гипоксия угнетает синтез NO в эндотелии. При умеренной гипоксии активность eNOS увеличивается в результате повышения концентрации внутриклеточных ионов Ca²⁺, уровень которого коррелирует с высвобождением эндотелиального NO [27]. Для ферментативного окисления L-аргинина с участием NOS требуется кислород. При ишемии/гипоксии NOS-синтазный механизм ингибируется. В то же время дефицит кислорода активирует более мощную нитритредуктазную компоненту, которая замыкает цепь метаболических превращений NO в цикл без участия eNOS [2, 3].

Идентифицирован регуляторный элемент в позиции –5373 до –5366 гена eNOS, ответственный за гипоксию. Исследователи выяснили, причастны ли известные факторы гипоксии HIF-1 и HIF-2 к промоторной активности гена eNOS при гипоксии. В двух исследованиях сообщалось об индуцированной гипоксией экспрессии гена eNOS, но без подтверждения вовлечения механизма, связанного с факторами HIF-1 и HIF-2. Другими исследованиями

было установлено, что элемент, ответственный за гипоксию — транскрипционный фактор HIF-2, предпочтительно связывается с элементом HRE в условиях гипоксии и активирует транскрипцию гена eNOS [40, 41].

Терапевтический эффект статинов связан с повышением уровня мРНК eNOS

Представляют научный и практический интерес механизмы, посредством которых статины (ингибиторы гидрокси-3-метилглутарилкоэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазы) изменяют липид-независимую кардиоваскулярную защиту. Основное внимание сфокусировано на вазоактивных и ангиогенных свойствах статинов, а также на возможной роли eNOS в опосредовании этих эффектов. Симвастатин и ловастатин, например, снижают зону ишемического церебрального инфаркта путем увеличения церебрального тока крови при нормохолестеринемии [42]. Этот цереброваскулярный нейропротекторный эффект регулируется повышением уровня мРНК eNOS. При ишемии у мышей линии eNOS^{-/-} статины не проявляют защитного действия. Помимо этого, статины предотвращают снижение экспрессии eNOS, вызванное окисленными ЛПНП, гипоксией и ФНО-α [43, 44]. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы сопровождается повышением экспрессии eNOS в эндотелиальных клетках путем увеличения периода полужизни мРНК [45]. Последующие эксперименты показали, что индуцированное статинами повышение периода полужизни мРНК гена eNOS от 28 ч до 46 ч происходит без изменения транскрипционной активности. Факт пролонгирования периода полужизни транскрипта eNOS согласуется с полученными результатами, свидетельствующими о трехкратном повышении уровня мРНК гена eNOS после 24-часовой экспозиции клеток со статинами. Эффект ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы на уровень мРНК eNOS также связан с изменениями в изопреноидном синтезе и Rho/ГТФазной активностью [46]. Важно отметить участие посттрансляционных событий в эффекте статинов на eNOS. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы приводит к активации протеинкиназы Akt (протеинкиназы В) и влияет на посттрансляционное фосфорилирование белка eNOS [47, 48].

Полиморфизм гена eNOS и дисфункция сосудистого эндотелия

Еще одним существенным фактором, влияющим на уровень экспрессии eNOS, является полиморфизм гена. Частота мутаций в различных популяциях существенно отличается, что может в значительной степени объяснять распространенность той или иной патологии в разных этнических группах и популяциях.

Ген eNOS экстенсивно скринируется с целью выявления вариантов. Обнаруженные до настоящего времени варианты включают многочисленные единичные полиморфизмы нуклеотидов (SNPs), вариабельность тандемных повторов в интроне 4 и CA-повторов микросателлитных маркеров генов в интроне 13 [15, 49–60].

Существует необходимость в установлении взаимосвязи между функциональными изменениями (снижение активности или уровня экспрессии) белка и мутациями гена eNOS. Внимание сосредоточено на исследовании трех предполагаемых функциональных вариантов гена (–786T > C) (rs2070744), интрона 4 (повторения 27 пар азотистых оснований) и Glu298Asp (rs1799983).

Полиморфизм Glu298Asp в экзоне 7 связан с низкими плазменными концентрациями NO и уменьшением реактивности сосудов. Мета-анализ нескольких типов полиморфизма гена eNOS при ишемической болезни сердца (ИБС) показал, что коэффициент неравновесного сцепления равен 1,17 (95%-ный доверительный интервал – 1,07, 1,28) для Glu298Asp, 1,17 (95%-ный доверительный интервал – 1,07, 1,28) для –786T > C и 1,12 (95%-ный доверительный интервал – 1,01, 1,24) для интрона 4 [15, 55].

Отмечены значительные различия в частоте Asp298 и –786C аллелей в этнических группах [50–52]. Установлено, что для популяций Азии характерна более низкая частота гомозигот Asp298 и –786C (Asp/Asp – 0,48 % против европейцев 10,73 %; C/C – 7,6 % против европейцев 32,3 %) гена eNOS и относительно низкая частота распространенности ИБС. Пропорция субъектов, гомозиготных по аллелю интрона 4, оказалась сходной с азиатами (1,6 и 2,0 % соответственно). Существуют данные о

низкой частоте субъектов, гомозиготных по аллелю Asp298 среди америндов и в смешанной испаноязычной группе [15, 50–52].

Некоторые исследователи связывают полиморфизм Glu298Asp (rs1799983) гена eNOS с дозозависимым снижением ферментативной активности eNOS и снижением продукции NO [15]. Гомозиготы Asp/Asp характеризуются более низкой активностью eNOS по сравнению с генотипом Glu/Glu. Другим возможным механизмом влияния этого полиморфизма на уровень/активность eNOS может быть его неравновесное сцепление с еще не установленными функциональными вариантами гена eNOS [5, 59, 61]. Помимо этого, многочисленными исследованиями установлено, что эндотелий-зависимая вазодилатация в случае присутствия аллеля 298Asp (894T) повреждается, и этот тип полиморфизма, связанный с ИБС и гипертензией, является предиктором АС каротидной артерии. Более того, авторами была исследована связь между основным эффектором ренин-ангиотензиновой системы ангиотензином II и аллельным полиморфизмом G894T гена eNOS. Установлено, что этот тип полиморфизма определяет системный и почечный гемодинамический ответ на ангиотензин II. Этот эффект в большей степени проявляется у мужчин по сравнению с женщинами [62]. В связи с этим представляет научный и практический интерес исследование сочетанного влияния распространенного полиморфизма инсерция/делеция гена ангиотензинопредшественного фермента и аллеля 894T гена eNOS на развитие дисфункции эндотелия, гипертензии, АС, нефропатии.

При скринировании популяции с целью определения распространенности T-786C (rs2070744) полиморфизма в 5'-нетранслируемой области гена и его связи с патологией установлено, что гомозиготы C-786 чаще встречаются среди пациентов с АС коронарных артерий по сравнению с группой контроля (24,6 % против 14,5 %). Риск развития патологии был в 2,5 раза выше у гомозигот CC по сравнению с гомозиготами TT [60].

Таким образом, была установлена ассоциация этого типа полиморфизма с АС коронарных артерий, и эта ассоциация не зависела от других факторов риска. Результаты были под-

тверждены исследованиями других европейских популяций [15, 58].

Другими исследованиями было показано, что мутация $-786T > C$ в промоторной области гена eNOS влияет на уровень экспрессии гена. Низкий уровень мРНК гена eNOS и сывороточного уровня нитратов/нитритов отмечен у лиц с вариантом $-786C$. Отмечено также, что у субъектов с аллелем $-786C$ максимально снижен ток крови в предплечье в ответ на ацетилхолин, что является фармакологическим методом оценки продукции NO *in vivo*. Эта ассоциация еще должна быть подтверждена другими функциональными и популяционными исследованиями [15, 58, 60].

Итальянскими исследователями была отмечена связь между T-786C полиморфизмом и системой оценки критериев риска Duke – прогностическим индексом, который учитывает не только число стенозированных сосудов, но и процент сужения, анатомическую локализацию стенозов. На основании результатов исследования этой связи было сделано предположение о влиянии мутации на процесс ремоделирования сосудов при АС путем изменения продукции NO, что в свою очередь может оказывать воздействие на миграцию и пролиферацию ГМК.

Подтверждение этой гипотезы было получено при исследовании мутантной линии мышей, у которых отмечено парадоксальное утолщение стенок сосудов, сопровождающееся гиперплазивным ответом артериальной стенки при наложении лигатуры на каротидную артерию, что указывает на связь мутации с патологическим ремоделированием, изменением сосудистой стенки, морфологически сходным с атеросклеротическим [49, 55]. В заключение можно отметить, что для итальянской популяции два типа полиморфизма гена eNOS связаны с существенными ангиографическими изменениями. Ученые предполагают, что сочетание двух типов полиморфизма T-786C и Glu298Asp в одном геноме связано с большим риском развития ИБС по сравнению с одним типом.

Подводя итоги, исследователи вынуждены констатировать, что в настоящее время нет достаточной информации, касающейся взаимосвязи этих вариантов гена eNOS. Выясне-

ние гаплотипов и неравновесного сцепления между полиморфными локусами гена eNOS позволило бы более полно исследовать роль eNOS в развитии сердечно-сосудистой патологии. Изучение полиморфизма eNOS в дальнейшем было расширено исследованиями в рамках двух международных проектов – HarMap и Seattle SNPs [63, 64]. В этих исследованиях внимание было сфокусировано на определении мутаций генов, связанных с воспалением и сердечно-сосудистой болезнью. В дальнейшем эти данные используются для определения неравновесного сцепления между отдельными вариантами гена eNOS в различных популяциях и этнических группах.

Полиморфизм гена eNOS, затраты энергии и нарушение толерантности к глюкозе

Инсулинорезистентность относится к факторам риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Этот фактор оказывает влияние на эндотелиальные ГМК артерий и артериол [65, 66].

NO эндотелиального происхождения усиливает захват глюкозы мышечными клетками. Физические нагрузки индуцируют синтез NO клетками и являются инсулин-независимым дополнительным способом поступления глюкозы в клетку [67]. Нарушение захвата глюкозы мышцами происходит вследствие нарушения сигнального пути инсулина и эндотелиальной дисфункции. Из трех форм NOS только две (нейрональная и эндотелиальная) индуцируются физической активностью. При сокращении скелетной мышцы уровень NO возрастает от 50 до 200 %. Интенсивные тренировки индуцируют хроническую NO-зависимую вазодилатацию. Ингибирование всех изоформ NOS снижает захват глюкозы скелетными мышцами и другими периферическими, чувствительными к инсулину тканями, что свидетельствует о зависимости этого механизма от NO [68].

Несмотря на то, что многими исследованиями доказан позитивный эффект физической активности на чувствительность тканей к инсулину и толерантность к глюкозе даже при дефиците инсулина, возможные механизмы инсулин-независимого захвата глюкозы клетками, опосредованные вазодилатационными свойствами NO, исследованы недостаточно.

Синтез eNOS усиливается после мышечно-го сокращения и напряжения сдвига. Есть данные, подтверждающие, что модификации гена eNOS оказывают эффект на вазодилатацию и захват глюкозы при физической активности, но убедительных эпидемиологических подтверждений этому нет [69, 70]. Двумя исследованиями была проверена связь между полиморфизмом eNOS и давлением крови. HERITAGE (Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics) исследования проводили анализ связи полиморфизма Glu298Asp и давления крови после 20 недель тренировок. Снижение давления крови было отмечено у большинства гомозигот Glu298. В другом исследовании популяции Японии было установлено, что связь между физической активностью и снижением давления опосредована вариантом гена eNOS, локализованного в интроне 4. Зависимость между физической активностью и давлением крови была обратной у носителей минорного аллеля, но отсутствовала у гомозигот [71, 72].

По утверждению других авторов гомозиготы Asp298 чувствительны к снижению давления, базального тока крови и снижению вазодилатации в ответ на аденозин в их коронарных артериях после физической нагрузки. Некоторыми исследованиями установлено, что у гомозигот Asp298 повышен системный прессорный ответ на фенилэфрин и снижен ток, опосредованный дилатацией плечевой артерии [71], но другими авторами такой закономерности не установлено [73]. Для подтверждения или отрицания этих факторов необходимы более обширные исследования.

Franks et al. [68] исследовали влияние полиморфизма гена eNOS на толерантность к глюкозе на фоне физической нагрузки у лиц с диабетом ($n = 461$) и в контрольной группе ($n = 474$) у американцев и испанцев европейского происхождения с нарушением толерантности к глюкозе. Исследование не подтвердило, что варианты гена eNOS влияют на риск возникновения диабета, толерантность к глюкозе и модифицируют связь между затратами энергии и толерантностью к глюкозе.

Для значительной части популяционных исследований, анализирующих связь между полиморфизмом гена eNOS и толерантностью

к глюкозе при диабете второго типа, установлена связь между полиморфизмом и гипертензией, нефропатией, ретинопатией и ИБС. Большая часть исследователей отметили ассоциацию Glu298Asp полиморфизма с базальной продукцией NO и со снижением токозависимой вазодилатации. Механизм токозависимой вазодилатации обеспечивает адаптацию сердца и скелетных мышц к повышенной потребности в кислороде при физической нагрузке. Помимо оптимизации доставки крови к тканям, токозависимый механизм обеспечивает интеграцию центральной и локальной гемодинамики.

По мнению других исследователей ассоциация полиморфизма eNOS с артериальной гипертензией, АС, преэклампсией, инсультом и диабетом остается сомнительной [74–76]. До настоящего времени нет надежных подтверждений относительно взаимодействий ген – ген или ген – окружающая среда. Использование этих вариантов в прогнозировании вряд ли будет приемлемым в ближайшее время. Существует потребность в масштабном генетическом исследовании ассоциации полиморфизма, чтобы подтвердить или опровергнуть роль вариантов гена eNOS при ИБС и других сердечно-сосудистых осложнениях.

Полиморфизм других генов, причастных к синтезу оксида азота и эндотелиальной дисфункции

Уменьшенная биодоступность NO может быть следствием сниженной экспрессии или активности эндотелиальной eNOS, увеличенной генерации асимметричного диметиларгинина (ADMA) – эндогенного ингибитора NO, сниженной доступности 6R-тетрагидробиоптерина (BH₄) – основного кофактора NO или инактивации NO реактивными формами кислорода (РФК), такими как супероксид-радикал (O₂⁻) [77].

Полиморфизм генов, регулирующих синтез ADMA, может оказывать значительный эффект на синтез NO, ингибируя фермент NOS. Концентрация ADMA, аналога субстрата NOS L-аргинина, повышается при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, включая артериальную гипертензию, почечную болезнь и периферическую артериальную окклюзивную

болезнь. ADMA удаляется из кровообращения двумя изоформами диметиларгинин-диметил-аминогидролазой (DDAH). Изоформа DDAH2 преобладает в тканях, экспрессирующих eNOS, таких как эндотелий. Причины, вызывающие повышение уровня ADMA при риске сосудистой болезни, неизвестны, но исследователи предполагают, что полиморфизм гена фермента DDAH, который изменяет экспрессию или активность, может быть одной из них [78]. Шесть различных видов полиморфизма были идентифицированы в гене DDAH2. Пять из них расположены вверх по течению от начала трансляции и могли бы влиять на транскрипцию гена. Полиморфизм делеция/инсерция (6G/7G) в положении 2871, который находится в основной области промотора, влияет на активность промотора DDAH2. Степень влияния этого полиморфизма на метаболизм ADMA и эндотелиальную функцию *in vivo* должны уточнить дополнительные исследования.

Потенциальными кандидатами риска эндотелиальной дисфункции могут быть варианты генов, вызывающие дефицит BH_4 — кофактора eNOS. NOS в случае дефицита BH_4 образует O_2^- из кислорода и NADPH, а не NO [79]. Количество доступного кофактора зависит от скорости его синтеза и инактивации. Инактивация BH_4 , вероятно, происходит путем взаимодействия с РФК в сосудистой стенке. Продукция *de novo* BH_4 необходима для трех ферментов: ГТФ-циклогидролазы, 6-пируват-тетрагидроптеринсинтазы и сепиаптеринредуктазы. Локальное внутрисосудистое воздействие BH_4 у курильщиков, гипертоников или у лиц с гиперхолестеринемией восстанавливает нормальную функцию эндотелия, тогда как на здоровые сосуды та же самая доза кофактора не оказывает никакого воздействия. Это наблюдение предполагает, что при патологических изменениях сосудов доступность BH_4 может быть ограничена. Начальный этап в синтезе этого соединения — это преобразование ГТФ в дигидронеоптерин под действием лимитирующего фермента ГТФ-циклогидролазы-1 (ГТФЦГ-1). Экспрессия ГТФЦГ-1 может стимулироваться цитокинами, и это связано с повышением внутриклеточного BH_4 в эндотелиальных клетках. Сообщалось о более чем 80 редких мутациях в гене ГТФЦГ-1 человека, связанных с

редким моногенетическим неврологическим нарушением — ДОФА-зависимой дистонией. Недавними исследованиями идентифицировано два общих полиморфизма в области промотора гена, которые могут быть связаны с плазменными концентрациями неоптерина — маркерного гена синтеза BH_4 [79].

Образование O_2^- происходит в сосудистой системе посредством нескольких ферментов, включая NADPH-оксидазу и, при некоторых обстоятельствах, NOS. Экспрессия NADPH-оксидазы или уровень ее активности могут быть снижены в патологически измененных кровеносных сосудах. Представляет интерес исследование генетических вариантов одной специфической субъединицы этого ферментного комплекса (p22phox) как фактора риска сосудистых событий. Редкие мутации p22phox гена CYBA вызывают аутомно-рецессивную хроническую гранулематозную болезнь, но сосудистая функция системно не была исследована у этих индивидуумов и неизвестно, склонны ли они к развитию АС [80, 81]. Результаты исследований общего полиморфизма С242Т гена CYBA, который кодирует замену His72RTrg в потенциальном гем-связывающем центре, противоречивы. Установлено, что аллель 242Т связан со сниженной активностью NADPH-оксидазы в кровеносном сосуде у пациентов с АС коронарных артерий [82]. ТТ генотип был также связан с увеличенной токозависимой дилатацией плечевой артерии у 93 пациентов, что составляло 30 % пациентов с ИБС. Существуют данные о том, что этот аллель может оказывать защитное действие, снижая продукцию O_2^- [83]. Эти данные были в дальнейшем подтверждены исследованиями популяции Японии. Аллель 242Т чаще встречался в группе контроля по сравнению с ИБС или в группе с коронароспазмами [84, 85]. В других исследованиях аллель 242Т связывают с ускоренной прогрессией ИБС и сниженной регрессией болезни в ответ на гипополипидемическую терапию по сравнению с гомозиготами СС [86]. С242Т полиморфизм не коррелировал со степенью выраженности АС коронарной артерии в контингенте 689 белых австралийцев. Другими исследованиями связь С242Т варианта гена с эндотелиальной дисфункцией была подвергнута сомнению [87].

Заключение

NO является ключевым регулятором сосудистого гомеостаза. Физиологическая и патофизиологическая роль этой молекулы интенсивно изучается. В синтезе NO участвуют несколько систем: ферментативная, связанная с окислением L-аргинина в присутствии кислорода, и нитритредуктазная, активирующаяся в условиях дефицита кислорода. Различные физиологические и патологические условия могут модулировать уровень экспрессии eNOS в эндотелиальных клетках как через транскрипционные механизмы, так и через посттранскрипционные. На протяжении последнего десятилетия для исследования сосудистой функции были созданы генетически модифицированные модели животных, что позволило не только получить интересные научные данные, но и применить их в клинической практике. Новые технологии открывают неограниченные возможности для исследования физиологии сосудов, их патологии и обеспечивают базисную терапию при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Таким образом, регуляция гена eNOS представляет собой сложный процесс, в результате которого конечная концентрация функциональной eNOS является следствием действия многих факторов, включая активность промоторного ответа, действие факторов, обеспечивающих различный период полужизни мРНК, регуляцию экспрессии в ответ на различные физиологические стимулы.

N.A. Kravchenko, N.V. Yarmish

REGULATION OF ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE EXPRESSION AND DYSFUNCTION OF VESSEL ENDOTHELIUM AT CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). NO participates in regulation of physiologically important cardiovascular functions (contractive reduction of heart, cellular proliferation, a tone of vessels and blood pressure), immunity, and nervous systems. Inflammation factors, hypoxia, lipids affect NO synthesis. Intensity of eNOS gene transcription depends on polymorphic alleles of eNOS gene, posttranscriptional mechanisms providing mRNA stability. All these factors have effects on development of cardiovascular events.

Н.О. Кравченко, Н.В. Ярмиш

РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ ТА ДИСФУНКЦІЯ СУДИННОГО ЕНДОТЕЛІУ ПРИ СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ ПАТОЛОГІЇ

Оксид азота (NO) утворюється з L-аргініну за допомогою ендотеліальної NO-синтази (eNOS). NO бере участь у регуляції фізіологічно важливих функцій серцево-судинної (регулює серцеве скорочення, проліферацію клітин, тонус судин та тиск крові), імунної та нервової систем. Синтез NO змінюється у відповідь на фактори запалення, гіпоксію, ліпіди та ін. Інтенсивність транскрипції гена eNOS залежить від поліморфних алелів гена eNOS та посттранскрипційних механізмів, які забезпечують стабільність мРНК. Всі ці фактори впливають на розвиток кардіоваскулярних ускладнень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Furchgott R.F., Zawadzki J.V.* The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature*. — 1980. — **288**. — P. 373–376.
2. *Северина И.С., Буссыгина О.Г., Пятакова Н.В.* Активация растворимой гуанилатциклазы новыми донорами NO как основа направленного поиска новых эффективных вазодилататоров и антиагрегантов // *Вестн. АМН Украины*. — 2000. — № 3. — С. 25–30.
3. *Реутов В.П.* Медико-биологические аспекты циклов оксид азота и супероксидного анион-радикала // *Вестн. АМН Украины*. — 2000. — № 3. — С. 35–41.
4. *Andrew P.J., Mayer B.* Enzymatic function of nitric oxide synthases // *Cardiovasc. Res*. — 1999. — **43**. — P. 521–531.
5. *Moncada S., Higgs A.* The L-arginine-nitric oxide pathway // *N. Engl. J. Med*. — 1993. — **329**. — P. 2002–2012.
6. *Зенков Н.К., Меньщиков Е.Б., Реутов В.П.* NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза // *Вестн. АМН Украины*. — 2000. — № 3. — С. 30–35.
7. *Jones T.C., Hingorani A.D.* Genetic regulation of endothelial function // *Heart*. — 2005. — **91**. — P. 1275–1277.
8. *Clarkson P., Celermajer D.S., Powe A.J. et al.* Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease // *Circulation*. — 1997. — **96**. — P. 3378–3383.
9. *Chan N.N., Colhoun H.M., Vallance P.* Cardiovascular risk factors as determinants of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactivity in the general population // *J. Amer. Coll. Cardiol*. — 2001. — **38**. — P. 1814–1820.
10. *Schachinger V., Britten M.B., Elsner M. et al.* A positive family history of premature coronary artery disease is

- associated with impaired endothelium-dependent coronary blood flow regulation // *Circulation*. – 1999. – **100**. – P. 1502–1508.
11. *Kuhlencordt P.J., Gyurko R., Han F. et al.* Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice // *Circulation*. – 2001. – **104**. – P. 448–454.
 12. *Corretti M.C., Anderson T.J., Benjamin F.J. et al.* Guidelines for the ultrasound assessment of endothelin-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery reactivity // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2002. – **39**. – P. 257–265.
 13. *Philip I., Plantefevre G., Vuillaumier-Barrot S. et al.* G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine // *Circulation*. – 1999. – **99**. – P. 3096–3098.
 14. *Vallance P., Chan N.* Endothelial function and nitric oxide clinical relevance // *Heart*. – 2001. – **85**. – P. 342–350.
 15. *Casas J.P., Cavalleri G.L., Bautista L.E. et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review // *Amer. J. Hum. Gen. Epidemiol.* – 2006. – **17**. – P. 1–15.
 16. *Katusic Z.S., Caplice N.M., Nath K.A.* Nitric oxide synthase gene transfer as a tool to study biology of endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Biol.* – 2003. – **23**. – P. 729–736.
 17. *Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W. et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**. – P. 17478–17488.
 18. *Karantzoulis-Fegaras F., Antoniou H., Lai S. et al.* Characterization of the human endothelial nitric oxide synthase promoter // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P. 3076–3093.
 19. *Laumonier Y., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F.* Characterization of an upstream enhancer region in the promoter of the human endothelial nitric-oxide synthase gene // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 40732–40741.
 20. *Davis M.E., Grumbach I.M., Fukai T. et al.* Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor Kappa-B binding // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 4170–4174.
 21. *Cattaruzza M., Guzik T.J., Slodowski W. et al.* Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease // *Circ. Res.* – 2004. – **95**. – P. 841–847.
 22. *Wedgwood S., Mitchell C.J., Fineman J.R., Black S.M.* Developmental differences in the shear stress-induced expression of endothelial NO synthase: changing role of AP-1 // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. L650–L662.
 23. *Iwase K., Miyataka K., Shimizu A. et al.* Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 11929–11933.
 24. *Saura M., Zaragoza C., Cao W. et al.* Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression // *Circ. Res.* – 2002. – **91**. – P. 806–813.
 25. *Bouloumie A., Schini-Kerth V.B., Busse R.* Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – **41**. – P. 773–780.
 26. *Navarro-Antolin J., Rey-Campos J., Lamas S.* Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. A role for activator protein-1 // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 3075–3080.
 27. *Cai H., Davis M.E., Drummond G.R., Harrison D.G.* Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca⁽²⁺⁾/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2001. – **21**. – P. 1571–1576.
 28. *Fulton D., Gratton J.P., Sessa W.C.* Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – **299**. – P. 818–824.
 29. *Lopez-Ongil S., Hernandez-Perera O., Navarro-Antolin J. et al.* Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells // *Brit. J. Pharmacol.* – 1998. – **124**. – P. 447–454.
 30. *Liao J.K., Shin W.S., Lee W.Y., Clark S.L.* Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**. – P. 319–324.
 31. *Chavakis E., Dermach E., Hermann C. et al.* Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway // *Circulation*. – 2001. – **103**. – P. 2102–2107.
 32. *Hirata K., Miki N., Kuroda Y. et al.* Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells // *Circ. Res.* – 1995. – **76**. – P. 958–962.
 33. *Alonso J., Sanchez de Miguel L., Monton M. et al.* Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha // *Mol. Cell Biol.* – 1997. – **17**. – P. 5719–5726.
 34. *Sennequier N., Stuehr D.J.* The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase // *Biochemistry*. – 1996. – **5**. – P. 5883–5892.
 35. *Neumann P., Gertzberg N., Johnson A.* TNF{alpha}-induces a decrease in eNOS-promoter activity // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* – 2003. – **7**. – P. 437–443.

36. Robb G.B., Tai S.C., Mawji I.A. et al. Functional characterization of eNOS 3'-mRNA regions: efficient translation and active stabilization of oligo (A) transcripts // Nitric Oxide. — 2002. — **6**. — P. 454.
37. Lai P.F., Mohamed F., Monge J.C., Stewart D.J. Downregulation of eNOS mRNA expression by TNF α : identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR // Cardiovasc. Res. — 2003. — **59**. — P. 160–168.
38. Aoki N., Siegfried M., Lefer A.M. Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries // Amer. J. Physiol. — 1989. — **256**. — P. H1509–H1512.
39. Arnet U.A., McMillan A., Dinerman J.L. et al. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**. — P. 15069–15073.
40. Coulet F., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F. Identification of hypoxia response element in the human endothelial nitric oxide synthase gene promoter // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**. — P. 3235–3248.
41. Justice J.M., Tanner M.A., Myers P.R. Endothelial cell regulation of nitric oxide production during hypoxia in coronary microvessels and epicardial arteries // J. Cell Physiol. — 2000. — **182**. — P. 359–365.
42. Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals // Nat. Med. — 2000. — **6**. — P. 1004–1010.
43. Huang P.L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency // J. Amer. Soc. Nephrol. — 2000. — **11**. — P. S120–S123.
44. Li D.Y., Chen H.J., Mehta J.L. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation // Cardiovasc. Res. — 2001. — **52**. — P. 130–135.
45. Endres M., Laufs U., Huang Z. et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**. — P. 8880–8885.
46. Laufs U., Liao J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**. — P. 24266–24271.
47. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation // Nature. — 1999. — **399**. — P. 601–605.
48. Luo Z., Fujio Y., Kureishi Y. et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo // J. Clin. Invest. — 2000. — **106**. — P. 493–499.
49. Colombo M.G., Paradossi U., Andreassi M.G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease // Clin. Chem. — 2003. — **49**. — P. 389–395.
50. 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**. — P. 719–725.
51. Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: metaanalysis of 26 studies involving 23028 subjects // Circulation. — 2004. — **109**. — P. 1359–1365.
52. Rosas-Vargas H., Flores-Segura A., Guizada-Claure B. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico // Hum. Biol. — 2003. — **75**. — P. 91–96.
53. Serrano N.C., Casas J.P., Diaz L.A. et al. eNOS genotyping and risk of preeclampsia: a multicentric case-control study // Hypertension. — 2004. — **44**. — P. 702–707.
54. Wu Y.W., Lee C.M., Hsu S.M. et al. Association between endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and the risk of premature coronary artery disease in Taiwan // J. Int. Med. Taiwan. — 2003. — **14**. — P. 1–10.
55. Wolff B., Braun C., Schluter C. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu (298)/Asp polymorphism, carotid atherosclerosis and intima-media thickness in a general population sample // Clin. Sci. (Lond). — 2005. — **109**. — P. 475–481.
56. Markus H.S., Ruigrok Y., Ali N. et al. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma // Stroke. — 1998. — **29**. — P. 1908–1911.
57. 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**. — P. 1515–1520.
58. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T (-786/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**. — P. 628–634.
59. Golser R., Gorren A.C., Mayer B. et al. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system // Nitric Oxide. — 2003. — **8**. — P. 7–14.
60. Rossi G.P., Taddei S., Virdis A. et al. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients // J. Amer. Coll. Cardiol. — 2003. — **41**. — P. 938–945.
61. Tsukada T., Yokoyama K., Arai T. et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with

- plasma NO metabolite levels in humans // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **245**. – P. 190–193.
62. *Page A., Reich H., Zhou J. et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene/gender interactions and the renal hemodynamic response to angiotensin II // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2005. – **16**. – P. 3053–3060.
 63. *Seattle SNPs.* Program for Genomic Applications. Supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute, Seattle, WA. (URL: <http://pga.gs.washington.edu>). (Accessed January 1, 2005).
 64. *International HapMap Project.* (URL: <http://www.hapmap.org/>). (Accessed January 1, 2005).
 65. *Smith D.O., LeRoith D.* Insulin resistance syndrome, pre-diabetes, and the prevention of type 2 diabetes mellitus // *Clin. Cornerstone.* – 2004. – **6**, № 2. – P. 7–16.
 66. *Saad M.F., Rewers M., Selby J. et al.* Insulin resistance and hypertension. The insulin resistance atherosclerosis study // *Hypertension.* – 2004. – **43**, № 6. – P. 1324–1331.
 67. *Hambreeht R., Adams V., Erbs S. et al.* Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase // *Circulation.* – 2003. – **107**. – P. 3152–3158.
 68. *Franks P.W., Luan J., Barroso S.B. et al.* Variation in the eNOS gene modifies the association between total energy expenditure and glucose intolerance // *Diabetes.* – 2005. – **54**. – P. 2795–2801.
 69. *Monti L.D., Barlassina C., Citterio L. et al.* Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome // *Diabetes.* – 2003. – **52**. – P. 1270–1275.
 70. *Lund D.D., Faraci F.M., Miller F.J. Jr., Heistad D.D.* Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits // *Circulation.* – 2000. – **101**. – P. 1027–1033.
 71. *Rankinen T., Rice T., Perusse L. et al.* NOS3 Glu298Asp genotype and blood pressure response to endurance training: the HERITAGE family study // *Hypertension.* – 2000. – **36**. – P. 885–889.
 72. *Kimura T., Yokoyama T., Matsumura Y., Yoshiike N. et al.* NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity // *Hypertension.* – 2003. – **41**. – P. 355–360.
 73. *McDonald D.M., Alp N.J., Channon K.M.* Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells // *Pharmacogenetics.* – 2004. – **14**. – P. 831–839.
 74. *Hingorani A.D.* Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* – 2003. – **5**. – P. 19–25.
 75. *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**. – P. 130–137.
 76. *Hingorani A.D.* Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis // *Atherosclerosis.* – 2001. – **154**. – P. 521–527.
 77. *Vallance P., Leiper J.* Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**. – P. 1023–1030.
 78. *Jones L.C., Tran C.T.L., Leiper J.M. et al.* Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **310**. – P. 836–843.
 79. *Alp N.J., Channon K.M.* Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**. – P. 413–420.
 80. *Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.* NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease // *Circulation Res.* – 2000. – **86**. – P. 494–501.
 81. *Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D. et al.* Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis // *Circulation.* – 2000. – **102**. – P. 1744–1747.
 82. *Schachinger V., Britten M.B., Dimmeler S. et al.* NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function // *Eur. Heart J.* – 2001. – **22**. – P. 96–101.
 83. *Inoue N., Kawashima S., Kanazawa K. et al.* Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease // *Circulation.* – 1998. – **97**. – P. 135–137.
 84. *Murase Y., Yamada Y., Hirashiki A. et al.* Genetic risk and gene-environment interaction in coronary artery spasm in Japanese men and women // *Eur. Heart J.* – 2004. – **25**. – P. 970–977.
 85. *Cahilly C., Ballantyne C.M., Lim D.S. et al.* A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis // *Circulation. Res.* – 2000. – **86**. – P. 391–395.
 86. *Cai H., Duarte N., Wilcken D.E. et al.* NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1999. – **29**. – P. 744–748.
 87. *Schneider M.P., Hilgers K.F., Huang Y. et al.* The C242T p22phox polymorphism and endothelium-dependent vasodilation in subjects with hypercholesterolaemia // *Clin. Sci. (Lond).* – 2003. – **105**. – P. 97–103.