

Распространенность, патогенетическое и прогностическое значение полиморфизма промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с острым коронарным синдромом

А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай, В.Е. Досенко, Н.В. Довгань, А.А. Мойбенко

*Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины, г. Киев,
Институт физиологии им. А.А. Богомольца АМН Украины, г. Киев*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полиморфизм гена, эндотелиальная NO-синтетаза, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, прогноз

Эндотелий стенки сосуда участвует в поддержании баланса между расслаблением и сокращением сосуда, анти- и протромбогенностью, давлением и стимуляцией клеточной пролиферации [20]. Функция эндотелия осуществляется посредством высвобождения эндотелийзависимых факторов релаксации (ЭЗФР) и констрикции (эндотелин-1). К эндотелийзависимым факторам релаксации относят оксид азота, простаглицлин (PGI_2) и эндотелийзависимый гиперполяризующий фактор. Основное значение в реализации функций эндотелия имеет оксид азота (NO), который синтезируется эндотелиальной NO-синтетазой [1, 13, 28]. Помимо общеизвестных влияний на сосудистый тонус, агрегацию тромбоцитов, оксид азота влияет на активность иммунокомпетентных клеток и антиоксидантных систем. Подавление или уменьшение активности эндотелиальной NO-синтетазы приводит к недостатку оксида азота – дисфункции эндотелия, которой, согласно классической теории «ответ на повреждение», отводится основная роль в инициации атерогенеза, а также развитию атеротромбоза [1–3, 20, 24, 27, 36, 38].

NO-синтетаза принадлежит к семейству оксидоредуктаз. В настоящее время описаны три изоформы NO-синтетаз: нейрональная изоформа (*nNOS*, *NOS1*), макрофагальная, или индуцибельная, изоформа (*iNOS*, *NOS2*) и эндотелиальная изоформа (*eNOS*, *NOS3*) [7, 23, 25, 26, 30]. Эти ферменты гомологичны только на 50–60 % по своему аминокислотному составу и кодируются разными генами, находящимися в разных хромосомах [24, 25, 37]. В то время как эндотелиальная и нейрональная изоформы являются конституциональ-

ными разновидностями фермента, то индуцибельная NO-синтетаза экспрессируется в основном при воспалении или инфекционном процессе [23].

Ген, кодирующий *eNOS*, находится в хромосоме 7q35-36 и состоит из 26 экзонов (рис. 1) [18, 25]. Промотор гена *eNOS* содержит несколько доменов, то есть может регулироваться рядом факторов транскрипции [22, 25, 26, 51]. В 1995 г. A.D. Hingorani и соавторами было высказано предположение о наличии полиморфизма гена, кодирующего *eNOS*, что обуславливает наследственные отличия синтеза оксида азота и, тем самым, разную склонность к развитию атеросклероза [14, 15]. Предполагают, что полиморфизм промотора гена влияет на транскрипцию мРНК, в то время как полиморфизм экзона определяет белковую структуру и активность фермента. В настоящее время остается не до конца ясной роль полиморфизма интрона в регуляции синтеза различных ферментов, так как эта часть гена не кодирует белок (вырезается при формировании спелой РНК). До настоящего времени описан полиморфизм гена *eNOS* в 11 местах, 8 из которых изучались в качестве возможных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [44].

Наиболее изученными являются полиморфизм 4a/b 4-го интрона, полиморфизм G894T (*Glu298Asp*) 7-го экзона и полиморфизм T-786C промотора гена *eNOS* [8, 14, 31].

Наша работа посвящена изучению распространенности, патогенетического и прогностического значения полиморфизма T⁻⁷⁸⁶→C промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с острым коронарным синдромом в украинской популяции.

Материал и методы

В исследование включали пациентов, поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии Института кардиологии им. Н.Д. Стражеско с диагнозом нестабильная стенокардия (НС) или острый инфаркт миокарда (ИМ). Обследованы 108 (77 мужчин и 31 женщина) больных с острым коронарным синдромом (ОКС) без стойкой элевации сегмента *ST* на электрокардиограмме в возрасте 40–83 лет (в среднем (61,1±0,8) года). Критерием включения в исследование было наличие типичного ангинозного болевого синдрома в покое продолжительностью 10–30 мин в течение последних 24 ч до госпитализации с изменениями ЭКГ в покое (депрессия сегмента *ST* 1 мм и более или инверсия зубца *T* 2 мм и более как минимум в двух смежных отведениях). Острый ИМ и НС диагностировали на основании данных клинических, электрокардиографических и биохимических исследований, согласно существующим рекомендациям [5, 6]. В исследование не включали больных с хронической сердечной недостаточностью IIБ–III стадии, истинным кардиогенным шоком, тяжелой формой сахарного диабета, выраженной почечной и печеночной недостаточностью, бронхиальной астмой, нарушениями в системе гемостаза, острым нарушением мозгового кровообращения, травмой или большим хирургическим вмешательством, острыми хроническими воспалительными процессами или их обострением, онкологическими и системными заболеваниями. Контрольную группу составили 83 практически здоровых донора, у которых отсутствие сердечно-сосудистой патологии подтверждали данными анамнеза, ЭКГ и измерения артериального давления. Контрольная группа и группа больных не отличались по возрасту и соотношению полов ($P > 0,05$ по χ^2 -критерию).

Для генотипирования венозную кровь набирали в стерильных условиях в моноветты объемом 2,7 мл с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Германия), замораживали и сохраняли при темпе-

ратуре -20°C . ДНК выделяли из цельной крови с использованием наборов «Изоген» (Россия). Методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов определяли полиморфизм $T^{-786}\rightarrow C$ промотора по G. Ghilardi и соавторам с модификациями [10]. Для этого амплифицировали участок промотора указанного гена с помощью пары специфических праймеров: прямой (*sense*) – $5'$ -CAC CTG CAT TCT GGG AAC TGTA- $3'$ и обратный (*antisense*) – $5'$ -GCC GCA GTA GCA GAG AGAC- $3'$. Праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Для амплификации брали 1 мкл ДНК (концентрация 3–4 нг/мкл) и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфата магния, 200 мкМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 20 пМ каждого из праймеров и 0,5 ЕД Taq-полимеразы («АмплиСенс», Россия), объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. PCR проводили в термоциклере «Applied Biosystems 2700» («PerkinElmer», 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 *Pdii* («Ферментас», Латвия) в буфере *III Y⁺/Tango* следующего состава: 33 мМ трис-ацетата (pH 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, 0,1 мг/мл альбумина. Наличие в 786-м положении промотора тимидина препятствует рестрикции, а при замене на цитозин *Pdii* расщепляет амплифицированный участок промотора (размер 125 пар оснований) на два фрагмента – 95 и 30 пар оснований. Амплификаты фрагмента промотора после рестрикции разделяли в 2,5 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Визуализацию ДНК после горизонтального электрофореза (160 В на протяжении 40 мин) проводили с помощью трансиллюминатора («Биоком», Россия).

Материалы для анализа длительного наблюдения за больными получены путем личного контакта, телефонной беседы с больными, почтовой



Рис. 1. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы.

переписки и данных доступной медицинской документации. Регистрировали все неблагоприятные коронарные события (смерть, ИМ, госпитализация по поводу ИС, реваскуляризация) с указанием точной даты развития, а также медикаментозное лечение, которое больной принимал постоянно за период времени от момента предыдущего контакта.

Статистический анализ результатов проводили с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2000 и статистической программы SPSS (версия 11, США). При этом достоверность отличий определяли по χ^2 -критерию. Значение $P < 0,05$ считали достоверным.

Результаты и их обсуждение

Проведенное генотипирование полиморфизма $T^{-786} \rightarrow C$ промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с ОКС без элевации сегмента ST на ЭКГ выявило следующее соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и патологических гомозигот – 42,6; 40,7 и 16,7 %. В группе контроля это соотношение составляло соответственно 48,2; 45,8 и 6,0 % (рис. 2). Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов промотора в группе обследованных больных и группе контроля соответствовало равновесию Харди–Вейнберга.

Таким образом, у больных с ОКС примерно в 3 раза чаще, чем у здоровых доноров, выявляли гомозиготы с патологическим генотипом CC промотора гена eNOS (соответственно 16,7 и 6,0 %, $P=0,011$). Полученные данные позволяют предположить патогенетическое значение данного полиморфизма в развитии ОКС в украинской популяции. В эксперименте было показано, что наличие аллеля C в положении 786 промотора гена eNOS приводит к снижению его активности на $(52 \pm 11) \%$, а формирующийся в результате этого недостаток

eNOS является причиной уменьшения синтеза и высвобождения оксида азота и дисфункции эндотелия [32, 36, 37, 39, 42, 43, 47]. У людей с патологическим генотипом промотора гена eNOS (CC и TC) наблюдают увеличение тонуса венечных артерий, повышенную склонность к коронарному спазму и извращенной реакции венечных артерий на введение ацетилхолина, что может служить основой для развития ишемической болезни сердца (ИБС) и ОКС [31, 32, 48, 49]. Показано, что полиморфизм $T^{-786} \rightarrow C$ промотора связан с повышенным риском рестенозов после стентирования венечных артерий [11].

Согласно данным метаанализа, основанного на результатах 7 исследований, были отмечены достоверные отличия по частоте встречаемости гомозигот CC промотора гена eNOS среди здорового населения в различных этнических группах (1,1 % – для азиатского, 15,36 % – для неазиатского населения, $P < 0,0001$) [8]. Данные литературы относительно роли этого полиморфизма в развитии ИБС и ее острых проявлений противоречивы [4, 8, 9, 11, 12, 32, 33, 35, 41, 49].

Популяционное исследование, проведенное в 9 различных регионах Великобритании, показало, что соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и патологических гомозигот при анализе полиморфизма $T^{-786} \rightarrow C$ промотора составило соответственно 37,7; 47,8 и 14,5 %. Наблюдение в течение 8 лет за 2965 исследуемыми не выявило влияния полиморфизма промотора гена eNOS на частоту развития ИБС [19].

Встречаемость вариантов TT, TC, CC промотора в положении 786 у итальянцев примерно соответствует таковой в Великобритании [9, 10]. При этом риск развития ИБС был достоверно выше при гомозиготах CC, чем при гомозиготах TT ($OR=2,5$ (1,3–4,8), $P < 0,01$), причем генотип CC был независимым фактором риска развития коронарного атеросклероза [9]. Было показано, что сам факт наличия патологического аллеля C является фактором риска ИБС ($OR=1,7$ (1,1–2,8), $P=0,02$ при сравнении с генотипом TT), а среди больных с ИБС носители патологического аллеля C имели более выраженное атеросклеротическое повреждение венечных артерий по данным коронароангиографии [9]. В исследовании G. Ghilardi и соавторов у больных, прооперированных по поводу стеноза внутренней сонной артерии, генотип CC обнаруживали в два раза чаще, чем в группе контроля (соответственно 26 и 13 %, $P=0,018$), а у больных со стенозом сонной артерии генотип CC был более распространен в группе с изъязвлен-

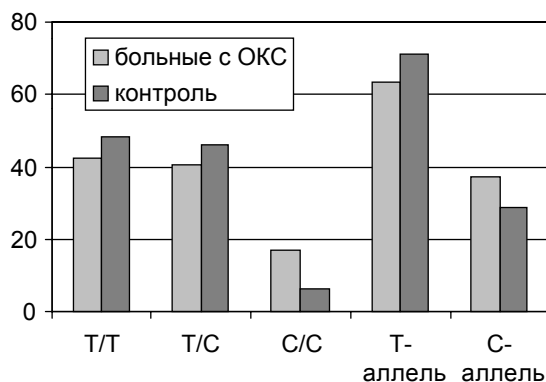


Рис. 2. Полиморфизм $T^{-786} \rightarrow C$ промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с ОКС и здоровых доноров.

Таблиця 1

Сравнительный анализ распределения частоты генотипов гена $T^{-786} \rightarrow C$ промотора эндотелиальной NO-синтазы у здоровых доноров разных этнических групп

Генотип	Частота выявления генотипов гена $T^{-786} \rightarrow C$ промотора eNOS, абс. (%), в исследовании									
	А.М. Пархоменко и соавт. (n=83), Украина	М. Colombo и соавт., 2003 [9] (n=138), Италия	G. Ghilardi и соавт., 2002 [10] (n=133), Италия	N. Jeeroburkhan и соавт., 2001 [19] (n=2720), Великобритания	R. Alvarez и соавт., 2001 [4] (n=300), Испания	O. Poirier и соавт., 1999 [35] (n=156), Северная Ирландия	O. Poirier и соавт., 1999 [35] (n=421), Франция	M.E. Hyndman и соавт., 2002 [16] (n=705), Канада	N. Iwai и соавт., 1999 [17] (n=3918), Япония	
ТТ	40 (48,2)	47 (34,1)*	54 (40,6)	1026 (37,7)*	120 (40)	57 (36,8)	126 (29,9)*	274 (38,9)	3127 (79,8)*	
ТС	38 (45,8)	71 (51,4)	61 (45,9)	1300 (47,8)	137 (45,7)	64 (41,3)	220 (52,3)	325 (46,1)	748 (19,1)*	
СС	5 (6,0)	20 (14,5)*	18 (13,5)*	394 (14,5)*	43 (14,3)*	34 (21,9)*	75 (17,8)*	106 (15,0)*	43 (1,1)*	

Примечание. * – различия показателей достоверны по сравнению с таковыми у здоровых доноров в украинской популяции ($P < 0,05 - 0,001$).

ной атеросклеротической бляшкой (соответственно 44 и 17 %, $P=0,003$) [10].

Встречаемость патологических гомозигот СС у испанцев моложе 60 лет составляет 14,3 %, в то же время среди курящих мужчин моложе 50 лет больных с ИБС этот генотип обнаруживали достоверно чаще – 21,8 % ($P=0,039$) [4]. Это послужило основанием предположить, что генотип СС промотора гена eNOS определяет повышенный риск преждевременного развития атеросклероза в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды (курение).

В исследование M.E. Hyndman и соавторов, проведенное в Канаде, было включено 705 мужчин среднего возраста без ИБС в анамнезе [16]. Соотношение различных вариантов генотипов (ТТ, ТС и СС) промотора гена eNOS было близким к таковому у европейцев и распределялось соответственно как 38,9; 46,1 и 15,0 %. У лиц с генотипом СС отмечали достоверно более высокие уровни систолического артериального давления, у них также более часто диагностировали артериальную гипертензию. Это позволило авторам сделать вывод, что генотип СС промотора гена eNOS является предрасполагающим фактором развития артериальной гипертензии.

В японской популяции встречаемость аллеля С, по данным исследования Suita, достаточно низкая (20,2 % населения), а встречаемость патологических гомозигот (СС) составляет около 1 % всего населения [17]. У больных с ИМ распространенность различных вариантов промотора не отличалась от таковой в общей популяции, что позволило сделать вывод об отсутствии роли этого полиморфизма в патогенезе острого ИМ у японцев [41]. Однако в исследованиях M. Nakayama и соавторов мутация $T^{-786} \rightarrow C$ ассоциировалась с коронар-

ным спазмом и чаще выявлялась у больных с ИМ, особенно без органического стеноза венечных артерий по данным ангиографии [32, 33].

Таким образом, патологический генотип СС промотора гена eNOS встречается у 6,0 % здоровых доноров в Украине, что достоверно больше, чем в японской популяции, и меньше, чем у западных европейцев (итальянцев, англичан, испанцев, французов), белых североамериканцев и австралийцев (табл. 1).

Распространенность данного генотипа у больных с ОКС в нашем исследовании была достоверно выше, чем в контроле, что указывает на роль полиморфизма $T^{-786} \rightarrow C$ гена eNOS в патогенезе ОКС и совпадает с данными ряда исследований в других этнических группах [4, 9, 33].

В нашем исследовании частота встречаемости различных генотипов $T^{-786} \rightarrow C$ промотора гена eNOS не зависела от пола больных. Наблюдала тенденцию к увеличению частоты выявления носителей аллеля С у больных младших возрастных групп (рис. 3).

Эта зависимость была более характерна для мужчин (табл. 2).

Так, у обследованных мужчин в возрасте до 55 лет (с преждевременным развитием ИБС) достоверно чаще выявляли патологический аллель С (генотипы СС+ТС), чем у более больных пожилого возраста, а также в общей группе больных с ОКС (соответственно 80,0 и 57,4 %, $P=0,018$). У женщин с преждевременным развитием атеросклероза (до 65 лет) подобная закономерность выявлена не была.

Таким образом, полиморфизм промотора гена eNOS играет наиболее существенную роль в развитии ОКС у мужчин до 55 лет. Именно для этой категории больных более характерно участие ва-

Таблиця 2
 Распределение генотипов промотора гена eNOS у больных с ОКС в зависимости от возраста и пола

Мужчины	< 55 лет (n=25)	≥ 55 лет (n=52)
Возраст, лет	50,1±0,8	65,1±0,9*
Носители аллеля Т	21 (84,0 %)	44 (84,6 %)
Носители аллеля С	20 (80,0 %)	27* (51,9 %)
Женщины	< 65 лет (n=17)	≥ 65 лет (n=14)
Возраст, лет	58,6±1,5	69,6±1,1°
Носители аллеля Т	14 (82,4 %)	11 (78,6 %)
Носители аллеля С	7 (41,2 %)	8 (57,1 %)

Примечание. Различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * – у мужчин в возрасте до 55 лет; ° – у женщин в возрасте до 65 лет (P<0,009).

зоспастических реакций в развитии острых форм ИБС, что было ранее показано при мутации T⁻⁷⁸⁶→C промотора [5, 32].

Выявление полиморфизма промотора гена eNOS у курильщиков, пациентов с АГ и больных с сахарным диабетом не отличалось от такового в общей группе больных (P>0,05).

У больных с различным генотипом промотора гена eNOS (при нормальных гомозиготах, гетерозиготах и патологических гомозиготах) одинаково часто использовали антитромбоцитарные препа-

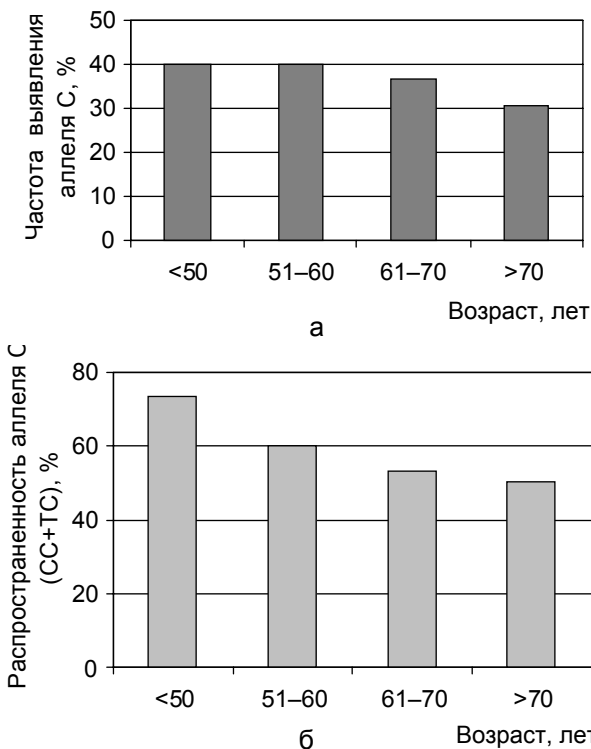


Рис. 3. Полиморфизм промотора гена eNOS у больных с ОКС разных возрастных групп : а) частота выявления аллеля С; б) распространенность аллеля С.

раты и различные виды антикоагулянтной терапии. Также не отмечено различий по частоте применения основных групп антиангинальных препаратов (β-адреноблокаторов, антагонистов кальция, нитратов) в течение госпитального периода и по результатам длительного наблюдения.

Результаты длительного наблюдения за больными были получены для 98 (90,7 %) пациентов через 6 мес и для 90 (83,3 %) пациентов через 12 мес от момента включения в исследование. Было отмечено, что развитие как минимум одного из событий комбинированной конечной точки (смерть/нефатальный ИМ) как через 6, так и через 12 мес наблюдения регистрировали достоверно чаще в группе больных – носителей патологического аллеля С промотора гена eNOS. Полученные результаты представлены в виде кривых Каплана–Мейера на рис. 4.

Анализ второй комбинированной конечной точки (смерть/нефатальный ИМ/госпитализация по поводу ИС/реваскуляризация) показал, что у носителей патологического аллеля С наблюдали тенденцию к более частому развитию неблагоприятных коронарных событий в течение одного года наблюдения (рис. 5).

Влияние генотипа на результаты длительного наблюдения было более значимым в группе курильщиков (P=0,042). Ранее было показано, что курение является причиной дисфункции эндотелия и предрасполагает к развитию вазоспастических реакций [21, 29, 40, 50]. Считают, что именно токсическое влияние на стенку сосуда в основном и определяет роль курения в патогенезе атеросклероза.

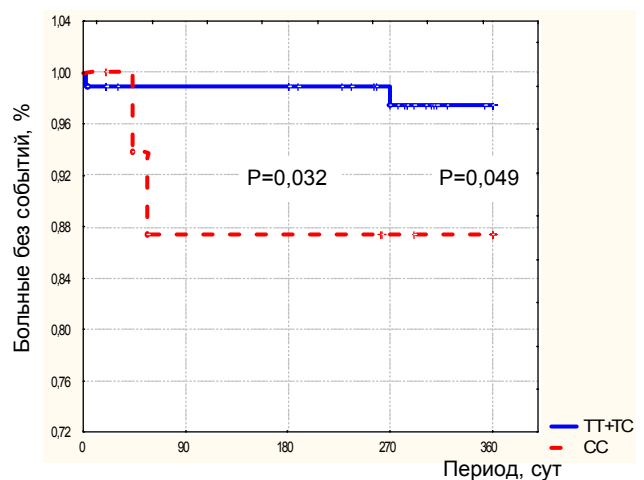


Рис. 4. Развитие комбинированной конечной точки «смерть/нефатальный ИМ» в течение 12 мес у больных с ОКС с патологическим генотипом СС и носителей нормального аллеля Т (ТТ+ТС).

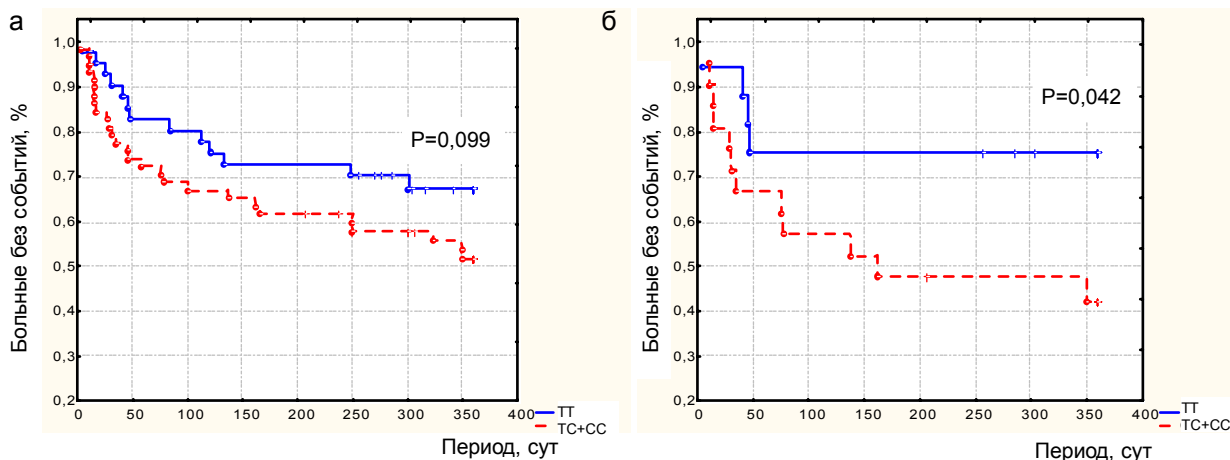


Рис. 5. Развитие комбинированной конечной точки «смерть/нефатальный ИМ/госпитализация по поводу ИС/реваскуляризация» в течение 12 мес у больных с ОКС с генотипом ТТ и носителей патологического аллеля С (СС+ТС) в общей группе (а) и у курильщиков (б).

за и атеротромбоза [40, 50]. В нашем исследовании показано, что действие неблагоприятных факторов окружающей среды в наибольшей степени реализуется в условиях генетической предрасположенности, в частности мутации гена *eNOS*. Подобные данные получены и другими исследователями. Так, X.L. Wang и соавторы показали, что мутация 4-го интрона гена *eNOS* (4a/b) только у курильщиков ассоциировалась с развитием ИБС [45]. К тому же только у курильщиков показано нарушение экспрессии гена *eNOS* при мутации его 4-го интрона (4a/b) или промотора (T⁻⁷⁸⁶→C) [46]. Влияние полиморфизма промотора гена *eNOS* на мозговой кровоток также наблюдали только у курящих лиц [34].

Выводы

1. Встречаемость патологического генотипа СС промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы в украинской популяции достоверно выше, чем в японской популяции, и меньше, чем у западноевропейцев, белых североамериканцев и австралийцев.

2. Генотип СС промотора примерно в 3 раза чаще встречается у больных с острым коронарным синдромом, чем у здоровых лиц, что указывает на роль полиморфизма T⁻⁷⁸⁶→C в патогенезе острого коронарного синдрома, особенно у мужчин с преждевременным развитием атеросклероза (до 55 лет).

3. Наличие патологического аллеля С в положении 786 промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с острым коронарным синдромом достоверно повышает риск развития неблагоприятных коронарных событий в течение 1 года

наблюдения, что в большей степени проявляется в условиях действия неблагоприятных факторов окружающей среды (курения).

Литература

1. Досенко В.Є., Загорій В.Ю., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. Патолофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журн. – 2002. – Т. 48. – № 6. – С. 86-102.
2. Мойбенко О.О., Павлюченко В.Б., Даценко В.В. та ін. Дослідження ролі ендотеліальних факторів у реалізації кардіогенних рефлексів за нормальних та патологічних умов // Фізіол. журн. – 2000. – Т. 46. – № 2. – С. 19-32.
3. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотеліально-активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу та діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – Т. 43. – № 1-2. – С. 3-18.
4. 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. – Vol. 5, № 4. – P. 343-348.
5. 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. – Vol. 23. – P. 1809-1840.
6. 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. – Vol. 102. – P. 1193-1209.
7. Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C. et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase // Nature. – 1991. – Vol. 351. – P. 714-718.
8. 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. – Vol. 109. – P. 1359-1365.
9. 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. – Vol. 49. – P. 389-395.

10. 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. – Vol. 48, № 7. – P. 989-993.
11. Gomma A.H., Elrayess M.A., Knight C.J. et al. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis // *Eur. Heart J.* – 2002. – Vol. 23. – P. 1955-1962.
12. Granath B., Taylor R.R., Van Bockxmeer F.M. et al. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population // *J. Cardiovasc. Risc.* – 2001. – Vol. 8. – P. 235-241.
13. Harrison D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 19. – P. 23-27.
14. Hingorani A.D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000 // *Atherosclerosis.* – 2001. – Vol. 154. – P. 521-527.
15. Hingorani A.D., Jia H., Stevens P.A. et al. A common variant in exon 7 of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene // *Clin. Sci.* – 1995. – Vol. 88. – P. 21.
16. Hyndman M.E., Parsons H.G., Verma S. et al. The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension // *Hypertension.* – 2002. – Vol. 39. – P. 919-925.
17. Iwai N., Katsuya T., Ishikawa K. et al. Human prostacyclin synthase gene and hypertension: the Suita Study // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100. – P. 2231-2236.
18. Janssens S.P., Shimouchi A., Quetermous T. et al. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 14519-14522.
19. Jeerooburkhan N., Jones L.C., Bujac S. et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease // *Hypertension.* – 2001. – Vol. 38. – P. 1054-1061.
20. Koenig W. Atherosclerosis involves more than just lipids: focus on inflammation // *Eur. Heart J.* – 1999. – Vol. 1 (Suppl. T). – P. 19-26.
21. Kugiyama K., Yasue H., Ohgushi M. et al. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers // *J. Amer. Coll. Cardiology.* – 1996. – Vol. 28. – P. 1161-1167.
22. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K. et al. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 6348-6352.
23. Lowenstein C.J., Glatt C.E., Bredt D.S., Snyder S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 6711-6715.
24. Luscher T.F., Tschudi M.R., Wenzel R.R., Noll G. Endotheliale dysfunction und stickstoff monoxid (NO; Nitric Oxide) // *Internist.* – 1997. – Vol. 38. – P. 411-419.
25. 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. – Vol. 268. – P. 17478-17488.
26. Marsden P.A., Schappert K.T., Chen H.S. et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 307. – P. 287-293.
27. Mehta J.L., Li D.Y. Inflammation in ischemic heart disease: Response to tissue injury or a pathogenetic villain? // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 43. – P. 291-299.
28. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol. 43. – P. 109-142.
29. Motoyama T., Kawano H., Kugiyama K. et al. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C // *Amer. J. Physiology.* – 1997. – Vol. 273. – P. 1644-1650.
30. Naber C.K., Siffert W., Erbe R., Heusch G. Genetics of human coronary vasomotion // *Arch. Mal. Coeur.* – 2004. – Vol. 97. – P. 255-260.
31. Naber C.K., Oldenburg O., Frey U. et al. Relevance of the T-786C and Glu298Asp variants in the endothelial nitric oxide synthase gene for cholinergic and adrenergic coronary vasomotor responses in man // *Circulation.* – 2003. – Vol. 106 (Suppl. L). – P. 1042 (Abstract).
32. 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 coronary spasm // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99. – P. 2864-2870.
33. 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. Cardiology.* – 2000. – Vol. 86, № 6. – P. 628-634.
34. Nasreen S., Nabika T., Shibata H. et al. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 22, № 4. – P. 605-610.
35. Poirier O., Mao C., Mallet C. et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene – no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 29. – P. 284-290.
36. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease // *New Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 340. – P. 115-126.
37. 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. Cardiology.* – 2003. – Vol. 41. – P. 938-945.
38. Sessa W.C. The nitric oxide synthase family of proteins // *J. Vasc. Res.* – 1994. – Vol. 31. – P. 131-143.
39. 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. – Vol. 49, № 6. – P. 847-852.
40. Sugishi M., Takatsu F. Cigarette smoking is a major risk factor for coronary spasm // *Circulation.* – 1993. – Vol. 87. – P. 76-79.
41. Takagi S., Goto Y., Nonogi H. et al. Genetic Polymorphisms of angiotensin converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (T(-788)C) genes in Japanese patients with myocardial infarction // *Thromb Haemost.* – 2001. – Vol. 86. – P. 1339-1340.
42. Tanus-Santos J.E., Desai M., Deak L.R. et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol // *Pharmacogenetics.* – 2002. – Vol. 12. – P. 407-413.
43. 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. – Vol. 245. – P. 190-193.
44. Wang X.L., Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease // *Molecular Genetics and Metabolism.* – 2000. – Vol. 70. – P. 241-251.
45. Wang X.L., Sim A.S., Badenhof 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. – Vol. 2. – P. 41-45.
46. 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. – Vol. 471. – P. 45-50.
47. Yoon Y., Song J., Hong S.H., Kim J.Q. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease // *Clin. Chem.* – 2000. – Vol. 46, № 10. – P. 1626-1630.
48. Yoshimura M., Nakayama M., Shimasaki Y. et al. A T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility // *Amer. J. Cardiology.* – 2000. – Vol. 85. – P. 710-714.

49. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786→C and missense Glu298Asp variants // J. Investig. Med. – 2000. – Vol. 48, № 5. – P. 367-374.

50. Zeiher A.M., Schachinger V., Minners J. Long-term cigarette

smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function // Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P. 1094-1100.

51. Zhang R., Min W., Sessa W.C. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 15320-15326.

Поступила 19.04.2005 г.

Prevalence, pathogenetic and prognostic significance of polymorphism of endothelial NO synthase gene in patients with acute coronary syndrome

A.N. Parkhomenko, Ya.M. Lutay, V.E. Dosenko, N.V. Dovgan, A.A. Moibenko

Nitric oxide (NO) is produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and plays an important role in normal vascular homeostasis. Various kinds of polymorphism have been identified in the eNOS gene. The T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism in the gene promoter has been demonstrated to modulate the eNOS gene expression and the synthesis of NO. But the prognostic role of T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism in patients with acute coronary syndromes (ACS) is still uncertain.

108 patients with ACS without ST elevation and 83 healthy controls were investigated. The eNOS polymorphism has been analyzed by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis. In Ukrainians the C/C genotype in the eNOS gene promoter was more common than in Japanese and less common than in west Europeans, North Americans and Australians. A significant difference in genotype distribution was observed between patients and controls. Pathological C/C genotype was significantly more often determined in ACS patients (16,7 % vs. 6,0 %, P<0,05), especially in men younger than 55 years old.

The analysis showed that C/C genotype in the eNOS gene promoter predispose to death / myocardial infarction during one-year follow-up, while T/T genotype was associated with decreased risk of recurrent ischemic events (death/myocardial infarction/rehospitalisation for unstable angina/revascularisation). The greatest risk of combined end-point development was shown in current smokers T⁻⁷⁸⁶→C allele carriers. Our results suggest that T⁻⁷⁸⁶→C allele carriers in the eNOS gene promoter have poor prognosis during one-year follow-up after ACS without ST elevation. This difference is more pronounced in current smokers. Toxic influence of nicotine on vascular endothelium may appear much greater in patients with impaired eNOS function.