

Патофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази

В обзорі приведені сведения о 14 аллельных вариантах промотора, экзонів и інтронів гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS) в зв'язі з їх роллю в формуванні схильності к сердечно-сосудистим захворюванням. Проаналізовані дані популяційних генетических досліджень, проведених в різних регіонах світа, котрі вказують на зв'язь між наявністю того или иного аллеля в геномі та ризиком розвитку ішемічної болізни серця. Основне уваження уделено в'ясненню зв'язі між окремими аллельними варіантами гена і функціональними (біохімічними) властивостями білка, кодуючогося цим геном. Акцентовано уваження на двох основних механізмах реалізації патологіческих аллельних варіантів гена eNOS: 1) утворення білка в недостатньому кількості или з зміненою активністю (порушення транскрипції, стабільності матричної РНК, утворення каталітически дефектного білка); 2) ускоренна деградація білка (за счєт ацидотического гідроліза или ускореного протеасомального протеоліза). Найбільш важливою в практическому аспекті, по мненню авторів, є проблема пошука фармакотерапевтических засад, здатних впливати на різні етапи молекулярно-біологіческої реалізації зміненого гена eNOS (транскрипцію, трансляцію, посттрансляційний процесинг і деградацію). З в'ясненнем вказаних патогенетических механізмів автори зв'язують широкі перспективи в побудові терапевтических схем для індивідуумів, являючихся носіями патологіческих аллелів даного гена.

З часів відкриття і до тепер продовжується вивчення монооксиду азоту (NO) як ендогенного регулятора судинного тонуусу [3, 5, 7, 10, 30, 66, 68]. За досить короткий проміжок часу було доведено важливе значення NO ендогенного походження в регуляції роботи багатьох органів і систем – в першу чергу, серцево-судинної системи [4, 8, 31, 67]. Відомо, що пригнічення активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS) є одним із провідних механізмів розвитку ішемічної хвороби серця (ІХС), порушень мозкового кровообігу та дисциркуляторних порушень у нижніх кінцівках, легенях, нирках, статевих органах тощо. Новий поштовх у дослідженнях ролі ендотеліальної NO-синтази в патогенезі серцево-судинної патології надали можливості генетичного аналізу, а саме з'ясування пос-

лідовності нуклеотидів у гені eNOS та встановлення декількох варіантів його генетичного поліморфізму [1, 2, 9, 41, 59, 64, 70]. Аллельні варіанти (разом 14) цього гена описано як у його промоторі, так і в екзонах та інтронах. Популяційні генетичні дослідження, проведені в різних регіонах світа, чітко вказують на взаємозв'язок наявності тих чи інших алелів у геномі та схильності до ІХС [6, 19, 21, 40, 77, 102, 110]. Основним завданням на сучасному етапі є дослідження зв'язку між певними генетичними варіантами гена та функціональними (біохімічними) властивостями білка, який ним кодується, тобто вивчення патогенетических механізмів реалізації зміненої генетичної програми.

Ген eNOS (рис. 1) розташований на довгому плечі 7-ї хромосоми (7q35-36) і скла-

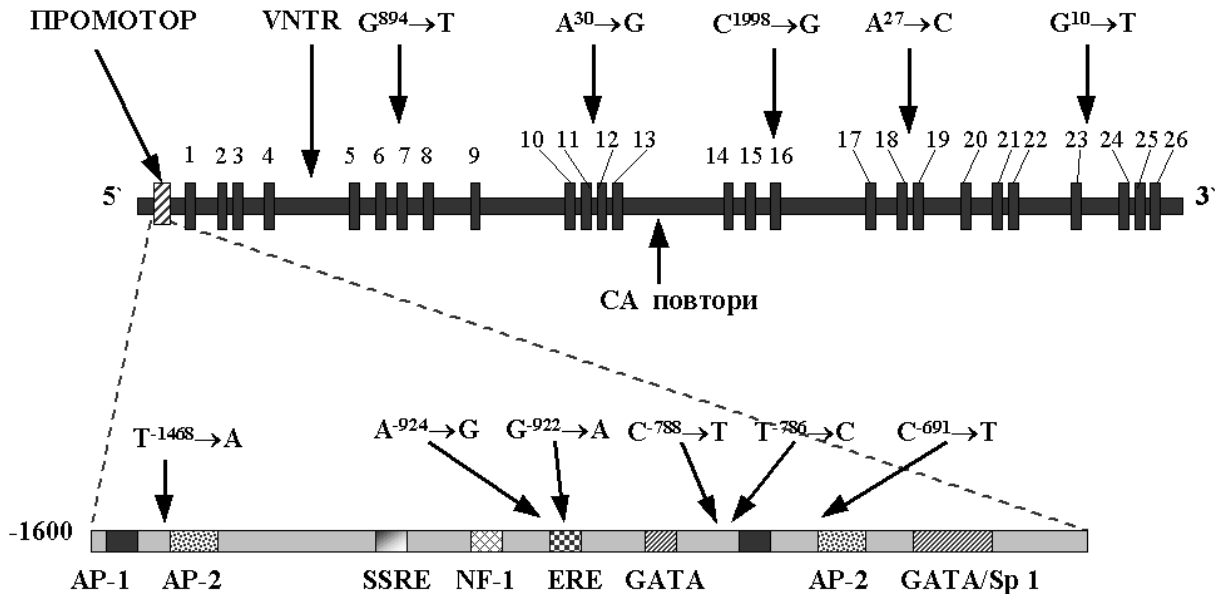


Рис. 1. Схематичне зображення гена eNOS із алейними варіантами. VNTR – тандемні повтори варіабельної кількості; AP-1, AP-2 – активуючі протеїни; SSRE – елемент, що реагує на тиск зсуву; NF-1 – ядерний фактор-1; ERE – естрогенчутливий елемент; Sp 1 – фактор транскрипції.

дається з 26 екзонів та 25 інтронів [10, 41]. Загальна кількість пар нуклеотидів – близько 21 тис. **Промотор** гена eNOS (5'-flanking region) містить декілька сайтів для зв'язування з транскрипційними факторами: AP-1, AP-2, NF-1, Sp-1, має естрогенчутливий елемент та елемент, що реагує на тиск зсуву. В промоторі цього гена виявлено шість місенс-мутацій (таблиця) [41, 72, 76, 107]. Слід звернути увагу на трансверсію у промоторі із заміною Т на С у -786 -му положенні ($T^{-786} \rightarrow C$). За даними проведеного у Японії популяційного дослідження (174 пацієнта з коронарним спазмом та 161 контрольний суб'єкт), мутації в промоторі ($T^{-786} \rightarrow C$, $A^{-922} \rightarrow G$, $T^{-1468} \rightarrow A$) значно частіше зустрічаються у хворих на ІХС, ніж у практично здорових осіб [71, 73]. З іншого боку, тими самими дослідниками встановлено, що не існує асоціації між $T^{-786} \rightarrow C$ поліморфізмом у промоторі гена eNOS та есенційною гіпертензією [44, 64].

Використавши люциферазний тест (luciferase reporter gene essay), японські вчені [71] довели, що при трансверсії $T^{-786} \rightarrow C$ значно зменшується функціональна активність

промотору гена eNOS. Водночас поліморфізм в інших його сайтах не впливав на інтенсивність транскрипції. Можливим механізмом впливу мутації $T^{-786} \rightarrow C$ у промоторі на зчитування гена eNOS є специфічне зв'язування білка реплікації A1 (RPA1) із мутованим сайтом промотору [65]. Цей протеїн відомий як білок, що здатний зв'язувати одноланцюгові молекули ДНК, і є необхідним для репарації, реплікації та рекомбінації. Саме внаслідок зв'язування RPA1 знижується активність промотору в разі заміни $T^{-786} \rightarrow C$. Це підтверджується тим, що введення олігонуклеотидної послідовності комплементарної RPA1 відновлює транскрипційну активність промотору гена eNOS при наявності зазначеної мутації. Було створено [71] кілька генетичних конструкцій: нормальний промотор гена eNOS та вектор гена люциферази (PGV-eNOSwt), промотор, що містить усі три алейних варіанти та вектор гена люциферази (PGV-eNOSmt), промотор, в якому спостерігався $T^{-786} \rightarrow C$ поліморфізм (PGV-eNOSmt1), промотор із заміною $A^{-922} \rightarrow G$ та PGV (PGV-eNOSmt2), промотор із

заміною T⁻¹⁴⁶⁸→A та PGV (PGV-eNOSmt3). Зазначені конструкції вводилися в ендотеліальні клітини людини та вивчалася експресія люциферази залежно від виду промотору за звичайних умов та при дії зменшеної концентрації кисню. Встановлено, що за умов норми активність люциферази була значно меншою в клітинах, до яких введено трансфекти PGV-eNOSmt та PGV-eNOSmt1. Причому в другому варіанті (PGV-eNOSmt1) активність була значно нижчою, ніж при використанні промотору з трьома мутаціями (-52 та -22 % відповідно). При моделюванні клітинної гіпоксії активність люциферази підвищувалася в усіх клітинах, що зазнали трансфекції, незалежно від введеної конструкції. Але приріст активності порівняно з нормоксичним станом суттєво відрізнявся: при введенні конструкції PGV-eNOSwt він становив 110 %, при PGV-eNOSmt – 38, при

PGV-eNOSmt1 – 69, PGV-eNOSmt2 – 102 та при PGV-eNOSmt3 – 92 %. В цих копітких експериментах встановлено важливість мутації T⁻⁷⁸⁶→C у формуванні зміненої ініціації транскрипції гена eNOS, що призводить до зменшення кількості інформаційних РНК eNOS та зменшення кількості білкових молекул eNOS. Каталітична активність їх може бути і не зміненою, але сумарна кількість монооксиду азоту, що синтезується клітинами, зменшується (рис. 2). Встановлено [115] збільшення базального тону та підвищення відповіді на введення ацетилхоліну та ізосорбиду епікардіальних коронарних артерій у людей із T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізмом, що, на думку вчених, свідчить про зменшення синтезу NO в ендотеліальних клітинах.

Поліморфізм в інших сайтах промотору eNOS нібито не впливає на активність транскрипції гена, але не виключено, що у разі



Рис. 2. Патогенетичні механізми, що призводять до збільшення ризику виникнення серцево-судинної патології при деяких алельних варіантах ендотеліальної NO-синтази.

впливу не гіпоксії, а інших чинників, ці мутації також будуть мати патофізіологічні наслідки. Наприклад, трансверсія А⁻⁹²²→G в естрогенчутливому елементі промотору (AP-1) може зумовити змінену реакцію на дію естрогенів, що здатні активувати зчитування гена eNOS (див. рис. 1).

Варіанти алельного поліморфізму описано і в трьох екзонах гена eNOS [14, 21, 37, 41, 59, 75]. Найбільшу увагу нині привертає місенс-мутація із заміною G⁸⁹⁴→T, яка призводить до заміни глутамату на аспарат у 298 положенні (Glu²⁹⁸→Asp), що відповідає оксигеназному домену білка eNOS (рис. 3). Проте амінокислота у 298-му положенні не бере участі у формуванні активного центру [10]. Частота цього алелю збільшена у осіб з серцево-судинними захворюваннями (рис. 4), але вона суттєво коливається у жителів різних регіонів світу (таблиця) [41, 45, 55, 57, 74, 76, 93, 106, 114, 116, 117].

У найбільш широкомасштабному дослідженні, проведеному у Великій Британії [41], частота патологічного алелю G⁸⁹⁴→T в гомозиготному стані у хворих на ІХС становила 35,9, тоді як у контролі не перевищувала 10,2%. Носіїв патологічного гена в гетерозиготному стані (Glu/Asp варіант) при цьому в контрольній групі було навіть більше, ніж у хворих на ІХС. При дослідженні частоти алельного поліморфізму G⁸⁹⁴→T у хворих, що перенесли інфаркт міокарда виявлено, як не

дивно, менш значні відмінності порівняно зі здоровими особами – 18,1 та 8,7% відповідно. Частота виявлення патологічного гена в гетерозиготному стані у хворих на інфаркт міокарда та практично здорових людей була приблизно рівною.

В японській популяції частота зазначеного алелю різко відрізняється від англійської (рис. 4) [40]. Патологічний алель у гомозиготному стані виявляється частіше у хворих на гострий інфаркт міокарда, але становить лише 2,2% (P<0,05). Однак серед 357 обстежених контрольної групи не було виявлено жодного такого випадку. Частота варіантів Glu/Glu та Glu/Asp у хворих та здорових осіб суттєво не відрізнялася.

Італійські вчені [21, 76] довели чітку асоціацію між алельним поліморфізмом гена eNOS та розвитком ІХС, ступенем її важкості та кількістю уражених коронарних судин. У 171-го пацієнта з ІХС порівняно з контрольною групою (наявність ІХС виключалася за допомогою ангиографічного дослідження) частота генотипів Glu/Glu, Glu/Asp, Asp/Asp становила 44,4, 39,2, 16,4% (в контролі 42,1, 51,8, 6,1%). Кількість стенозованих коронарних судин у людей із двома патологічними алелями (варіант Asp/Asp) була вірогідно вищою порівняно з власниками нормальних алелей чи гетерозиготами (Glu/Glu, Glu/Asp). Більш того, в цьому дослідженні було доведено, що судини людей із генотипом Asp/Asp

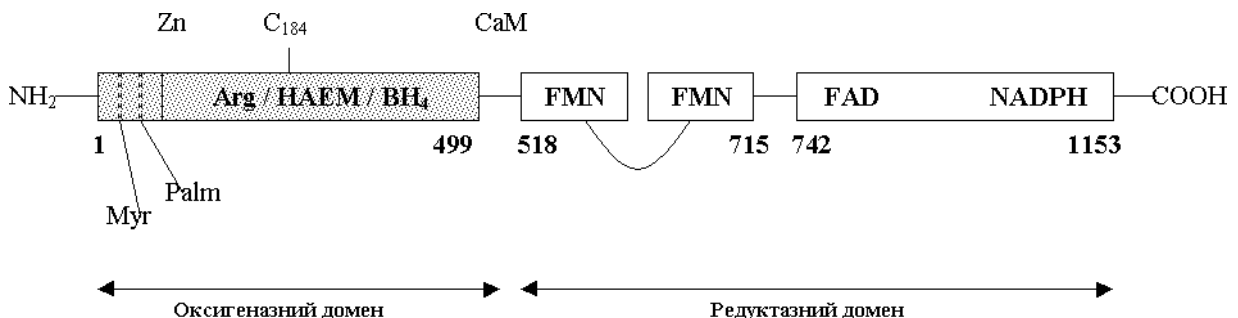


Рис. 3. Схематичне зображення білка eNOS. Myr, Palm – місця приєднання міристинової та пальмітинової кислот; Zn – місце зв'язування цинку із цистеїновими залишками; НАЕМ/ВН₄ – місце приєднання гему та тетрагідробіоптерину; CaM, FMN, FAD, NADPH – сайти зв'язування кальмодуліну, флавінмононуклеотиду, флавінаденідинуклеотиду, нікотинаденідинуклеотидфосфату. Цифри вказують на порядкові номери амінокислотних залишків у білку (за W.K.Alderton та ін. [10]).

значно слабше відповідають на введення вазодилаторів (нітрогліцерину). Діаметр плечової артерії в них збільшувався лише на 7%, тоді як у осіб із нормальним генотипом або носіїв патологічного алелю (Glu/Glu, Glu/Asp) діаметр судини збільшувався на 18%. Цей факт, на нашу думку, потребує окремого аналізу. Нітрогліцерин є прямим донором нітратних груп і NO, що утворюється при цьому, опосередковує переважну більшість ефектів зазначеного препарату, зокрема і його вазодилаторну дію. Якщо передбачати, що внаслідок зміни амінокислотної послідовності в білку eNOS відбувається пригнічення активності ферменту, то введення екзогенних нітратів повинно було б призвести до більш вираженого розширення судин, ніж у носіїв нормального алелю. Однак у вищезгаданому дослідженні [76] було отримано протилежні результати – у носіїв патологічних алелей реакція плечової артерії на введення вазодилатора була менш вираженою. Таку реакцію слід очікувати від судин, що знаходяться під постійним впливом надлишку відповідного медіатора, в нашому випадку – NO. Цікаві дані, що підтверджують цю думку, було отримано групою корейських вчених [114]. Виявилось, що концентрація нітратів та нітритів (NO₂⁻ та NO₃⁻; NO_x) у плазмі крові,

взятої натщесерце, у хворих на ІХС була значно вищою (95,9 мкмоль/л), ніж у здорових осіб (73,8 мкмоль/л). При порівнянні груп хворих на ІХС із гіпертензією та без неї виявилось, що концентрація нітратів та нітритів у групі осіб із гіпертензією вища (116 мкмоль/л), ніж у групі хворих на ІХС з нормальним артеріальним тиском (86,0 мкмоль/л). Особливо важливі дані було отримано при порівнянні концентрації NO_x у осіб контрольної групи із певним алельним поліморфізмом у гені eNOS: в осіб із генотипом Glu/Asp та Asp/Asp вміст NO_x був значно вищим, ніж у носіїв нормального гена (Glu/Glu) - 136,1 та 64,5 мкмоль/л відповідно. Щоправда, такої тенденції у хворих на ІХС не спостерігалось. Мутація в 4-му інtronі (яку більш докладно розглянемо далі) позитивно впливає на вміст eNOS у плазмі крові хворих на ІХС із гіпертензією – у носіїв патологічного алелю вміст NO_x був значно вищим, ніж у носіїв нормального гена (127,9 та 107,7 мкмоль/л відповідно). Отже, мутаційні зміни в гені eNOS можуть призводити до збільшення концентрації NO_x у плазмі крові. В цьому випадку факт, отриманий італійськими вченими, може мати своє логічне пояснення. Проте збільшення концентрації нітритів та нітратів може відбуватися зовсім не за

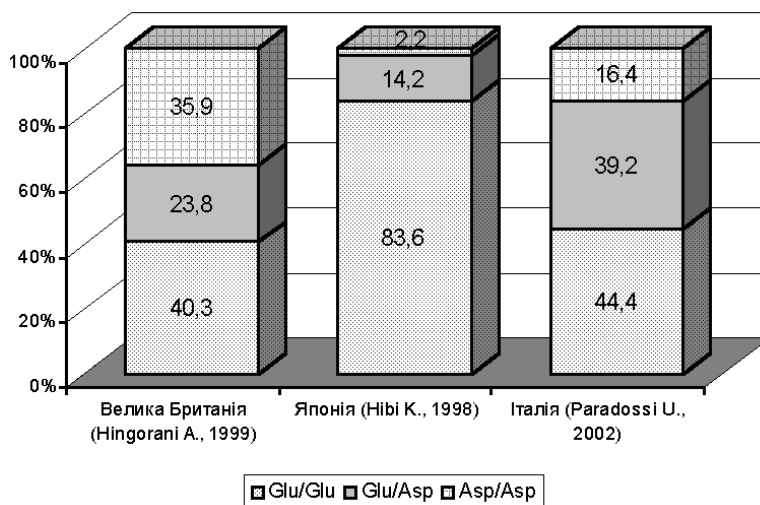


Рис. 4. Частота алельних варіантів гена eNOS (трансверсія G⁸⁹⁴ → Т в 7-му екзоні, яка призводить до заміни глутамата на аспаргат у 298-му положенні білка eNOS) у хворих на ішемічну хворобу серця в різних популяційних групах [40, 41, 76].

рахунок підвищення активності eNOS, а інших NO-продукуючих систем. Не виключено, що внаслідок порушення судинного тону (переважання вазоконстрикторних впливів) відбувається порушення мікроциркуляції у різних органах, що призводить до гіпоксії та активації індукбельної NOS (iNOS). Цей фермент здатний продукувати NO у значно більшій кількості, ніж eNOS, а, отже, призводить до збільшення загальної концентрації NO_x у крові. Можливо, у носіїв патологічних алелей гена eNOS це є певною компенсаторною реакцією на зменшення утворення NO в ендотеліальних клітинах.

Взагалі питання про вплив алельних варіантів eNOS на регуляцію судинного тону залишається проблематичним. У дослідженні Schneider [86] не було встановлено відмінностей у здатності відповідати на введення ацетилхоліну у людей з Glu²⁹⁸→Asp генотипом порівняно з контрольною групою. Це дає підстави авторам вважати, що патогенні впливи цього алельного варіанту не пов'язані з порушенням ендотеліальної вазодилатації. У дослідженнях Leeson та ін. [54] також не було встановлено різниці у чутливості судин до вазодилаторів (нітрогліцерину) між особами, поділеними на групи за Glu²⁹⁸→Asp поліморфізмом. З іншого боку, Philip I. та ін. [79] встановлено, що судини людей із Glu²⁹⁸→Asp генотипом значно сильніше відповідають на вплив вазоконстриктора фенілефрину. Проте коронарний кровотік у цих осіб збільшується меншою мірою за умов впливу аденозину [69].

Описано деякі інші місенс-мутації в екзонах гена eNOS (див. табл.), однак їх значення в розвитку серцево-судинної патології залишається невивченим. Трансверсія C⁷⁷⁴→T в 6-му екзоні взагалі не знаходить прояву у фенотипі (silence-mutation), тому що внаслідок вироджуваності триплету GAC при заміні C→T утворюється триплет GAT, що також кодує аспарат, і первинна структура білка не змінюється [75].

Найбільш загадковою є ситуація із фенотиповими проявами генетичного поліморфізму

в інтронах будь-яких генів, в тому числі і гена eNOS [9]. Нині описано декілька мутацій в **інтронах** гена eNOS (див. табл.). Усі праці, присвячені цьому питанню, можна поділити на дві приблизно рівні групи: в одних доводиться зв'язок між поліморфізмом в інтроні та розвитком серцево-судинної патології [82, 99, 110, 111], а в інших – заперечується такий зв'язок [40, 41, 42, 97, 114]. Австралійськими вченими [109, 120] уперше було встановлено зв'язок між поліморфізмом в тандемних повторах варіабельної кількості (VNTR) 4-го інтрону та частотою виникнення і важкістю ІХС. Одночасно було доведено, що у суб'єктів, які палять або палили у минулому, частота патологічного алелю гена (4a/4a, VNTR довжиною 393 пари нуклеотидів) в гомозиготному стані була значно більшою, ніж у людей, що не мають цієї звички. Ризик виникнення ІХС у курців при цьому був у 1,3 раза вище, ніж у загальній популяції. За даними Мустафіної та співавт. [6], поліморфізм в 4-му інтроні значно частіше виявлявся у хворих на артеріальну гіпертензію та інфаркт міокарда, причому розвиток есенційної гіпертензії спостерігався в етнічних росіян, а інфаркт міокарда – у татар. Корейські учені [114], що також досліджували частоту поліморфізму у 4-му інтроні виявили, що суттєвої різниці у розподілі алелей серед здорових осіб контрольної групи та хворих на ІХС немає. Те саме стосується G¹⁰→T поліморфізму у 23-му інтроні гена eNOS. Описано ще декілька поліморфізмів у інтронах гена eNOS, але їхня роль у патології не з'ясована і потребує додаткових досліджень.

Механізми реалізації мутаційних змін у інтронах – надзвичайно цікава проблема медичної генетики. Доведено, що мутації в інтронах можуть призводити як до збільшення активності чи кількості певного ферменту (ангіотензинконвертуючий фермент), так і до зменшення цих показників (можливо, це стосується eNOS). Припускається наявність декількох механізмів впливу поліморфізму в інтронах на реалізацію генетичної інформації.

Можливі варіанти алельного поліморфізму гена eNOS та їх частота в різних популяціях [6, 14, 21, 37, 40, 41, 42, 59, 72, 75, 76, 82, 97, 99, 107, 110, 111, 114]

Ділянка гена	Сайт поліморфізму	Частота алелів					
		У загальній популяції			у хворих із серцево-судинною патологією		
		AA	AM	MM	AA	AM	MM
Промотор	T ⁻¹⁴⁶⁸ →A	–	–	–	–	–	–
	A ⁻⁹²⁴ →G	–	–	–	–	–	–
	G ⁻⁹²² →A	–	–	–	–	–	–
	C ⁻⁷⁸⁸ →T	–	–	–	–	–	–
	T ⁻⁷⁸⁶ →C	93	7	0	70	28	2
	C ⁻⁶⁹¹ →T	–	–	–	–	–	–
Екзон	6 C ⁷⁷⁴ →T (Asp→Asp)	–	–	–	–	–	–
	7 G ⁸⁹⁴ →T (Glu ²⁹⁸ →Asp)	39,8 – 85,9	14,1 – 51,8	0 – 16,7	29,3 – 85,5	13,6 – 56	0,9 – 35,9
	16 C ¹⁹⁹⁸ →G	–	–	–	–	–	–
Інtron	4 420→393 п.н. VNTR	69 – 80	18 – 28	0 – 7	72,7 – 77,9	19 – 25	0,02 – 6,4
	11 A ³⁰ →G	–	–	–	–	–	–
	13 17 – 44 CA повтори	–	–	–	–	–	–
	18 A ²⁷ →C	–	–	–	–	–	–
	23 G ¹⁰ →T	87,5	12,5	0	98,2	1,8	0

Примітка: А – нормальний алель; М – мутантний алель; п.н. – пари нуклеотидів.

Найбільш простий, але найменш вірогідний варіант – зміни у нуклеотидній послідовності інформаційної РНК (іРНК) та відповідного білка внаслідок зсуву рамки зчитування при не вирізанні чи надлишковому вирізанні зміненого інтрону [2, 9]. Інші варіанти передбачають зміни у посттранскрипційній та посттрансляційній модифікації іРНК або навіть певного білка внаслідок мутаційних змін в інtronі. Нещодавно було відкрито вплив так званих дволанцюгових РНК (dsРНК) на експресію генів еукаріотів [38, 49]. Доведено, що введення вірусних dsРНК може специфічно блокувати експресію певних генів. Не виключено, що dsРНК утворюються і за звичайних умов у клітинах еукаріотів та мають певні біологічні функції. Наприклад, dsРНК, що можуть утворюватися з інtronів, за рахунок нуклеотидної специфічності пригальмовують зчитування відповідного гена, доки остаточно не завершиться сплайсинг іРНК, що утворилася при транскрипції цього гена. Мутація в інtronі, таким чином, може вплинути на активність транскрипції

певного гена. Можливо, що саме dsРНК відповідають і за деструкцію інtronів після сплайсингу, а при наявності поліморфізму цього не відбувається, і нерозщеплені фрагменти інtronів блокують транскрипцію або трансляцію. Який саме механізм реалізується у випадку алельного поліморфізму інtronів гена eNOS невідомо.

Узагальнюючи наведені дані про розповсюдження поліморфізму гена eNOS, слід виділити три варіанти поліморфізму, клінічне значення яких може вважатися доведеним: T⁻⁷⁸⁶→C у промоторі, G⁸⁹⁴→T в екзоні та 420→393 пари нуклеотидів VNTR у 4-му інtronі. Суттєві розбіжності за даними досліджень у різних регіонах світу у частоті виявлення цих варіантів та відповідно їх значущості у формуванні серцево-судинної патології пояснюються, в першу чергу, етнічними особливостями. Найбільш інформативним є дослідження Tanus-Santos [102], в якому було вивчено ДНК із чіткими етнічними ознаками. Варіант промотору C⁻⁷⁸⁶ значно частіше (P<0,0001) спостерігається у

европеїдів (42,0 %), ніж у афро-американців (17,5 %) чи азіатів (13,8 %). Частота патологічних гаплотипів Asp298 становила 34,5, 15,5 та 8,6 % відповідно ($P < 0,0001$). Поліморфізм інтрону, навпаки, частіше спостерігається ($P < 0,0001$) у афро-американців (26,5 %), ніж у європеїдів (16,0 %) та азіатів (12,9%). Ці відмінності, напевно, пояснюються впливом природного добору у популяціях, що знаходяться у специфічних природних та соціальних умовах.

Для кращого розуміння механізмів фенотипічних проявів генетичних варіантів eNOS, коротко зупинимося на механізмах регуляції експресії гена eNOS та посттрансляційного процесінгу білка eNOS. Як ми зазначали, у промоторній ділянці гена eNOS є багато сайтів для зв'язування з транскрипційними факторами, утворення яких індукуються факторами різної природи (рис. 1). Це тиск зсуву (6 сайтів впливу), естрогени, циклічні нуклеотид-фосфати, лізофосфатидилхолін, а також інсулін, епідермальний фактор росту, TGF- β , низькі концентрації окиснених ліпопротеїнів низької щільності, перекис водню тощо [7, 10, 22, 35]. Важливим показником експресії будь-якого гена є стабільність утвореної іРНК, що визначається за строком її напівжиття [20, 53]. Доведено, що строк напівжиття іРНК eNOS значно коливається залежно від стадії клітинного циклу, в якому знаходиться ендотеліальна клітина, та від її віку [60, 87]. Якщо клітина проліферує, то показник стабільності eNOS у 3 рази перевищує такий у клітинах, що не діляться (27 та 9 год відповідно), а вміст іРНК внаслідок цього збільшується у 4 рази [87]. Встановлено, що цей феномен зумовлений наявністю протеїну з молекулярною масою 51 кДа (p51), що здатний специфічно зв'язуватися з 3'-некодуючою ділянкою іРНК eNOS, а це призводить до прискореної деградації молекули іРНК. У проліферуючих клітинах рівень зв'язування цього протеїну з відповідною ділянкою іРНК eNOS знижений більше, ніж удвічі порівняно із клітинами в

стані спокою. Невідомо, які фактори сприяють зв'язуванню p51 із іРНК eNOS, і які фактори регулюють кількість його в клітині. Не виключено, що протеоліз p51 відбувається за рахунок протеасоми (див нижче), яка, до речі, має РНКазну активність [78, 81].

Після трансляції за будь-якого варіанту гена eNOS утворюється білок eNOS, що має пройти посттрансляційний процесінг [13]. Стосовно цього протеїну, то він полягає у ацилюванні – послідовному приєднанні залишків жирних кислот (пальмітинової, міристинової) до залишків амінокислот в N-кінцевій ділянці білка eNOS [10, 35, 56, 62, 63, 98]. Міристилювання відбувається під час трансляції (ко-трансляційно), має незворотний характер та забезпечує спрямування білка до комплексу Гольджі. Там згодом і відбувається приєднання пальмітату до двох цистеїнових залишків (Cys₁₅, Cys₂₆). Цей процес є принципово оборотним і регулюється багатьма факторами, що впливають на внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію. Не виключено, що депальмітоїлізація білка eNOS відбувається за участі тіоестераз, активність яких потенціюється кальцій-зв'язувальними білками, наприклад кальмодуліном. Саме ацилювання молекули eNOS спрямовує її до кавеол – спеціальних колбоподібних інвагінацій цитоплазматичної мембрани розміром від 50 до 100 нм, де eNOS і виконує свою функцію [27, 63, 89, 90]. В експерименті на тваринах доведено, що порушення цього процесу внаслідок нокауту генів, що забезпечують міристилювання, призводить до повного припинення функціонування білка eNOS без порушення його трансляції та без змін активності *in vitro* [35, 90]. У разі порушення пальмітоїлювання при сайтспрямованому мутагенезі в ділянці приєднання пальмітату активність ферменту знижується, але меншою мірою, ніж при порушенні міристилювання. У людини на сьогодні не описано патології, пов'язаної з цими процесами, але не виключено, що деякі генетичні варіанти можуть впливати на

посттрансляційну модифікацію білка за допомогою ацилювання і, таким чином, на його компартаменталізацію та активність. Доведено, що ензиматична активність eNOS у кавеолах у 9,4 раза перевищує таку в усій плазматичній мембрані та становить від 57 до 100 % активності ферменту у клітинній мембрані [90]. Слід зазначити, що інші ізоформи NOS (індуцибельна та нейрональна) також проявляють свою каталітичну активність саме у кавеолах [32].

У кавеолах білок eNOS взаємодіє з кавеолінами (основними структурними білками кавеол) – групою білків, що регулюють активність різних ферментів, які мають відповідну мембранну локалізацію [26, 27, 35, 62, 63]. Кавеолін безпосередньо пригнічує активність eNOS (так само як і активність індукцибельної та нейрональної NOS) за рахунок наявності в його структурі так званого “scaffold”-регіону. З іншого боку, в оксигеназному домені молекули eNOS є спеціальний 9-амінокислотний мотив (залишки амінокислот з 350 по 358), необхідний для з'єднання з кавеоліном. Мутація в цьому регіоні призводить до того, що кавеолін втрачає здатність пригнічувати активність eNOS [32]. Також описано взаємодію між редуктазним доменом eNOS та кавеоліном, що може впливати на каталітичну активність ферменту. У мишей, які позбавлені гена кавеоліну, активність eNOS значно підвищена, що є ще одним доказом того, що кавеолін є ендogenous інгібітором eNOS [26, 33, 84]. В разі потреби, після активації відповідних рецепторів (брадикінінових) eNOS здатна дисоціювати від кавеоліну та інтерналізуватися в цитозоль, де відбувається її активація іонами кальцію, після чого eNOS повертається до кавеол [10, 35]. Група дослідників під керівництвом Michel послідовно доводить, що в клітині працює біологічна система контролю за активністю eNOS, основне значення в якій відіграють реципрокні взаємовідносини кавеоліну та кальмодуліну [27, 29, 61].

Як і переважна більшість внутрішньоклітинних білків великої молекулярної маси, eNOS має підтримку шаперонів. Стосовно протеїну eNOS цю функцію виконує білок теплового шоку 90 (HSP90) [17, 88, 92]. Саме цей шаперон забезпечує зв'язування гему із білком eNOS і регулює активність ензиму [16, 88]. За умов хронічної гіпоксії саме асоціація HSP90 із білком eNOS, що значною мірою залежить від активності серин-треонінової протеїнкінази Akt, забезпечує збільшення синтезу оксиду азоту та обмежує eNOS-залежну генерацію супероксиданіон радикала [92, 94]. Інгібітори HSP90 (гельданаміцин) роз'єднують оксигеназну та редуктазну активність ферменту, що призводить до збільшення продукції O_2^- [104]. До того ж, за умови пригнічення функціональної активності шаперону HSP90, значно зменшується здатність артеріальних судин розширюватися у відповідь на дію ацетилхоліну [88]. Ще не з'ясовано, чи впливає алельний поліморфізм гена NOS на зв'язування білка eNOS із HSP90, але такий варіант порушення функціональних властивостей eNOS є цілком імовірним.

Ще одним важливим фактором, що визначає ефективність роботи eNOS в клітині, є стабільність цього протеїну у клітині, тобто термін, протягом якого він може виконувати свої функції. Нещодавно було продемонстровано, що білок із заміною Glu на Asp у 298-му положенні (вищезгадувана трансверсія $G^{894} \rightarrow T$) легко розщеплюється на два фрагменти: 35 кДа N-термінальний та 100 кДа C-термінальний [103]. Гідроліз відбувається саме за зв'язком, що утворюється між Asp₂₉₈ та Pro₂₉₉. “Дикий” тип eNOS у 298-му положенні містить глютамін. За умов *ex vivo* розщеплення потенціюється підвищенням температури та зниженням рН [25]. Передбачається, що це розщеплення є ацидотичним гідролізом білка eNOS невідомою протеїназою. Показано [25], що у культурі клітин COS7, трансфектованих кДНК нормального гена eNOS та гена із поліморфізмом $Glu^{298} \rightarrow Asp$ різниці в рівні виділення в

середовище метаболітів NO не було, тобто як нормальний, так і мутантний білок є каталітично активним і забезпечує нормальний синтез NO за звичайних умов культивування. Однак при зменшенні рН середовища нижче 5,0 упродовж 10 год відбувалось утворення 100 кДа фрагмента та зменшення напівжиття мутантної форми ензиму. Застосування таких різних екстремальних факторів, як вплив гіпоксичної суміші протягом 48 год, відтворення оксидативного стресу за допомогою перекису водню або вплив цитостатику стауроспорину не призводило до фрагментації мутантного варіанту eNOS. Автори не виключають, що феномен ацидотичного гідролізу $\text{Glu}^{298} \rightarrow \text{Asp}$ варіанта eNOS є артефактом, генерованим *in vitro*, однак із нормальним білком відповідних змін не відбувалося. В будь-якому разі, є підстави вважати, що алельний поліморфізм $\text{Glu}^{298} \rightarrow \text{Asp}$ збільшує вразливість білка до гідролізу, особливо за умови дії патологічних чинників. Внаслідок цього кількість білка зменшується і це зумовлює розвиток патологічних проявів недостатності ендогенного синтезу NO.

Більш імовірним механізмом, що забезпечує деградацію білка eNOS, є убіквітинзалежний протеасомальний протеоліз – система внутрішньоклітинної регуляції активності транскрипції генів, посттрансляційного процесінгу білків та деградації цитоплазматичних і мембранних протеїнів. Протеасома – це мультикаталітичний високомолекулярний протеолітичний комплекс, що забезпечує деградацію білків, до яких приєднується ланцюжок убіквітинів. Протеасомальному протеолізу в першу чергу підлягають білки із коротким терміном життя, які виконали свою функцію, фосфориливалися або зазнали ушкодження під дією вільнорадикального окиснення чи обмеженого протеолізу. Термін напівжиття білка eNOS досить короткий, він піддається фосфорилуванню (за тирозиновими, сериновими залишками або 495-им треоніновим залиш-

ком) і, звичайно, може легко окиснюватися під дією як власного монооксиду азоту (що він синтезує) або під дією інших окисників (O_2^- , H_2O_2) [7, 10, 91]. Отже, є всі передумови вважати, що деградація білка eNOS відбувається протеасомальним шляхом і вже отримано досить багато непрямих доказів цього.

Зіставлення даних рентгеноструктурного аналізу білка eNOS людини та iNOS миші дозволило встановити їх гомологічність. Glu^{298} у eNOS відповідає амінокислоті у 308-му положенні iNOS миші, але у формуванні активного центру, сайту зв'язування із субстратом бере участь Glu^{371} , що відповідає 361-му залишку Glu в eNOS людини [цит. за 41]. Тобто порушення активності ферменту та синтезу NO скоріш за все не пов'язано із ферментосубстратною взаємодією, а пояснюється впливом інших регуляторних факторів, серед яких значне місце посідає кавеолін-1. Так, на лінії пухлинних клітин було встановлено гіперекспресію iNOS разом із зменшенням вмісту кавеоліну-1 [26]. Трансфекція кДНК кавеоліну до цих пухлинних клітин призводила до відновлення експресії кавеоліну та зменшення активності iNOS за рахунок прискореного руйнування ферменту через протеасомальний протеоліз. Тобто зв'язування молекули нітрикоксидсинтази-2 із кавеоліном (практично виконує роль убіквітинлігази) запускає процес убіквітинізації із наступною деградацією за участі протеасоми [26]. Також доведено, що при заміні серину на пролін у 714-му положенні молекули iNOS у щурів термін напівжиття мутантної форми ферменту значно знижується – білок iNOS не визначається вже через 18 год культивування клітин лінії COS-7 із введеним мутантним варіантом гена [113]. Це і спричинює зменшення продукції NO, порівняно із нормальним варіантом цього білка. Важливо, що стабільність мРНК iNOS при цьому не змінювалась, і автори наполягають на посттрансляційних механізмах порушення функціонування ферменту. Застосування інгібітора

протеасоми (класто-лактацистин β -лактон) запобігало зменшенню кількості мутантної форми iNOS протягом культивування, що є свідченням участі протеасомального протеолізу в деградації NO-синтаз. Можна передбачити, що і в людини деякі алельні варіанти гена eNOS можуть більш швидко руйнуватися протеасомами або внаслідок більш щільної взаємодії із кавеоліном, або за рахунок прискореної убіквітинізації зміненого протеїну.

Підсумовуючи наведені дані, слід зазначити, що є, фактично, два основних механізми реалізації патологічних алельних варіантів гена eNOS: 1) утворення білка у недостатній кількості та з порушеною активністю; 2) прискорена деградація білків із нормальною активністю. В будь-якому разі це призведе до зменшення продукції NO. Подальші патофізіологічні прояви мутацій у гені eNOS на рівні організму є очевидними (рис. 2). В першу чергу, вони пов'язані із порушенням регуляції судинного тону, роль NO в якому вважається незаперечним фактом [3, 5, 7, 66, 68]. Якщо внаслідок алельного поліморфізму кількість NO, що виробляється eNOS зменшується, то судини будуть перебувати переважно у звуженому стані. Не дивно, що мутантні варіанти гена eNOS значно частіше виявляються серед хворих на артеріальну гіпертензію, яка є одним із провідних факторів атерогенезу [51, 95, 96]. У дослідженнях японських вчених частота генетичного варіанту Glu²⁹⁸→Asp у хворих на артеріальну гіпертензію більш ніж удвічі перевищує таку серед осіб із нормальним артеріальним тиском [64, 105, 112]. Внаслідок підвищеного тиску ендотеліальні клітини руйнуються і гладенькі м'язи артеріальних судин скорочуються навіть під дією вазодилаторів, що за нормальних умов реалізують свою дію через релаксуючий фактор ендотеліального походження. Доведено, що носії патологічного алелю Glu²⁹⁸→Asp резистентні до традиційної гіпотензивної терапії та вимагають інших підходів до лікування [43]. У мишей, дефіцитних за геном eNOS також спостерігається

артеріальна гіпертензія, але до неї приєднується інсулінова резистентність і гіперліпідемія [23, 24]. Ця трійця, фактично, відповідає метаболічному X-синдрому у людини, що є одним із найважливіших факторів розвитку атеросклерозу.

Іншим важливим механізмом реалізації патологічних варіантів eNOS є підвищення агрегаційних властивостей тромбоцитів, які також здатні до експресії eNOS та синтезу NO [28, 101]. Як артеріальна гіпертензія, так і гіперкоагуляція крові будуть сприяти прискореному розвитку атеросклерозу. Чітко встановлено, що вміст NO та eNOS значно зменшуються в атеросклеротично змінених судинах [46]. У свою чергу, атеросклероз артеріальних судин сприяє підвищенню артеріального тиску та адгезивності тромбоцитів.

Ще одним важливим моментом у патогенезі атеросклерозу та артеріальної гіпертензії є порушення балансу між проліферацією та апоптозом клітин судинної стінки [15, 34]. В останні роки сформувався уявлення, що NO – біфункціональний регулятор апоптозу, тобто за умов дії великих концентрацій NO (результат активації iNOS) розвивається апоптоз, а при дії низьких (дія eNOS) – клітини набувають здатності ухилятися від апоптозу [46]. Останнє відбувається за рахунок декількох механізмів: 1) NO збільшує утворення ц-ГМФ у клітині, що сприяє зменшенню концентрації кальцію та стимулює синтез білків-інгібіторів каспаз; 2) NO безпосередньо пригнічує активність каспаз за внаслідок нітрозилування цистеїну₁₆₃ в активному центрі цих тіолових протеїназ; 3) NO індукуює синтез білків теплового шоку або шаперонів (HSP – 32, 70), котрі проявляють анти-апоптичну активність за допомогою пригнічення активності каспаз і стабілізації мембран мітохондрій. Отже, при генетичних варіантах eNOS, що зумовлюють знижену здатність до синтезу NO, розвиток апоптозу стає більш імовірним, бо NO не вистачає для пригнічення систем реалізації програми

апоптозу. Прискорений апоптоз гладеньком'язових клітин серцевини атеросклеротичної бляшки є основою дестабілізації останньої із розвитком тромбозу та порушення кровопостачання того чи іншого органа [15].

Ще одним патофізіологічним наслідком генетичних дефектів eNOS є порушення іонного обміну. Добре відомо, що NO впливає на обмін іонів кальцію, калію, натрію та інших, а з іншого боку ті самі іони кальцію регулюють активність eNOS. Rakhit та ін. [83] було проведено електрофізіологічні дослідження на мишах із нокаутованим геном eNOS. Виявилося, що частота виникнення аритмій (порушення провідності, тахікардія, фібриляції передсердь, підвищення ектопічної активності вентрикулярних кардіоміоцитів) у цих тварин значно підвищується. Кардіоміоцити, ізольовані від тварин, дефіцитних за eNOS, проявляють підвищену здатність до тригерної активності [50]. Не виключено, що вплив NO на ритм серця зумовлено центральними ефектами цієї молекули [4, 85]. Гіперекспресія eNOS у клітинах центральної нервової системи спричинює виражену брадикардію, яка пов'язана з виділення γ -амінобутирату [47]. В будь-якому разі, порушення продукції NO призводить до аритмій. Проте ці експериментальні дані ще не підтверджено клінічними дослідженнями щодо встановлення кореляції між частотою алельних варіантів eNOS та частотою виникнення певних порушень ритму серця.

Серед проблемних питань, що очікують свого вирішення найближчим часом, слід виділити головні. По-перше, потрібно остаточно з'ясувати, що є основним патогенетичним механізмом порушення функціонування патологічних варіантів eNOS – зниження активності або прискорена деградація. По-друге, незрозумілими залишаються механізми реалізації генетичного поліморфізму в інтронах гена eNOS. І, нарешті, найбільш важливою в практичному аспекті є проблема пошуку фармакотерапевтичних засобів, що здатні впливати на різні етапи

молекулярно-біологічної реалізації зміненого гена eNOS (транскрипцію, трансляцію, пострансляційний процесінг, деградацію). Саме з'ясування зазначених патогенетичних механізмів може відкрити широкі перспективи у побудові лікувальних схем для індивідуумів, що є носіями патологічних алелів цього гена (фармакогенетичний підхід). Вчасна дозологічна генодіагностика дозволить вжити і профілактичних заходів для запобігання розвитку серцево-судинної патології. Вони можуть бути спрямовані на активацію транскрипції гена eNOS за допомогою, наприклад, препаратів з естрогенною активністю [108], активаторів NF-1, дозованого гіпоксичного навантаження [3, 12, 48, 80, 92], з одного боку, та пригнічення деградації протеїну eNOS протеасомальним шляхом, з іншого. Останній варіант впливу на метаболізм білка eNOS, на нашу думку, є більш перспективним та реалістичним. Нині інгібітори протеасоми пройшли експериментальне випробування як фармакологічні препарати для лікування артеріальної гіпертензії та реперфузійних ушкоджень [18, 100]. Не виключено, що одним із механізмів лікувальної дії інгібіторів протеасоми є пригнічення деградації білка eNOS. До існуючих схем фармакотерапії ІХС генодіагностика також може внести суттєві корективи. Наприклад, якщо у носіїв патологічного алелю кількість NO_x дійсно підвищена, то застосування препаратів нітрогліцерину є недоцільним і слід вживати інших заходів для поліпшення коронарного кровообігу (блокатори кальцієвих каналів, інгібітори ангіотензинконвертуючого ферменту (ACE) тощо). Застосування інгібіторів ACE стає більш обґрунтованим у зв'язку із наявністю позитивної асоціації між поліморфізмом T⁻⁷⁸⁶→C у промоторі eNOS та делецією в інтроне гена ACE, яка призводить до збільшення утворення ангіотензину II [11, 39, 58, 118]. Серед інших препаратів, що застосовуються для лікування атеросклерозу, також є перспективні екземпляри щодо використання при лікуванні хворих із гене-

тичною схильністю до ІХС. Наприклад, статини (аторвастатин) підвищують синтез eNOS у тромбоцитах, що зменшує адгезивну активність останніх та захищає мозок експериментальних мишей від ішемічного ушкодження [52].

Попередні результати наших власних досліджень, проведених сумісно з НДІ кардіології ім. М.Д. Стражеска, вказують на надзвичайно високу частоту патологічних алелів у хворих на нестабільну стенокардію. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції варіанти Glu/Asp та Asp/Asp виявлено у 90 % хворих. Цей варіант стенокардії відрізняється важким прогнозом та непередбачуваним клінічним перебігом. Подальше проведення популяційного дослідження дозволить встановити наскільки важливим є внесок алельного поліморфізму гена eNOS до загальної захворюваності на ішемічну хворобу серця в Україні.

V.E. Dosenko, V.Yu. Zagoriy, A.A. Moibenko, A.N. Parchomenko

PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF ENDOTHELIAL NO-SYNTASE GENETIC POLYMORPHISM

Information about fourteen allelic variants of promoter, exons and introns of a gene of endothelial NO-synthase (eNOS) dealing with their role in a susceptibility to cardio-vascular diseases has been reviewed. Data of the populational genetic studies, performed in different regions of the world, were analysed to show the interrelation between an availability of an allele in the genome and a risk of ischemic heart disease. The main attention was focussed on the clarification of a relation between some allelic variants of the gene and functional (biochemical) properties of the protein, encoded by this gene, as well as on two principal mechanisms of realization of the pathological allelic variants in eNOS gene: 1) forming the protein in an insufficient quantity or with an altered activity (an interrupted transcription, and stability of informational RNA, formation of a catalitically deficient protein); 2) an increased protein degradation (due to an acidic hydrolysis or an enhanced proteasomal proteolysis). In practical aspect, the most important problem, according to the point of view of the authors, is that of searching the pharmaco-therapeutical remedies, able to influence the different stages of the molecular-biological realization of an altered eNOS gene (transcription, translation, posttranslational modifications and degradation). Clarification of the above pathogenetic mechanisms will open

broad perspectives in constructing therapeutical schemes for individuals possessing the pathological alleles of this gene.

Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science, Kiev, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики. К.: – Здоров'я, 2001. – 126 с.
2. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб.: Спец. литература, 1997. – 287 с.
3. Малышев И.Ю., Монастырская Е.А., Смирин Б.В., Манухина Е.Б. Гипоксия и оксид азота // Вестн. Рос. Акад. мед. наук. – 2000, №9. – С.44 – 48.
4. Мойбенко О.О., Павлюченко В.Б., Даценко В.В. и др. Дослідження ролі ендотеліязалежних факторів у реалізації кардіогенних рефлексів за нормальних та патологічних умов // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №2. – С.19 – 32.
5. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію та біологічно-активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу та діяльності серця // Там само. – 1997. – 43, № 1 – 2. – С.3 – 18.
6. Мустафина О.Е., Шагисултанова Е.И., Насибуллин Т.Р. и др. Микросателлитный полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы: исследование популяций Волго-Уральского региона и анализ связи с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией // Генетика. – 2001. – 37, N5. – С.668 – 674.
7. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
8. Сагач В.Ф., Соловйов А.І., Базилюк О.В. та ін. Ендотеліязалежні судинні реакції у кроликів під час тривалої експериментальної гіперхолестеринемії // Фізіол. журн. – 1994. – 40, №2. – С.73 – 82.
9. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. – М.: Мир, 1998. – Т.1. – 373 с; Т.2. – 391 с.
10. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. – 2001. – 357. – P.593 – 615.
11. 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, N4. – P.343 – 348.
12. Arnet U.A., McMillan A., Dinerman J.L. et al. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, N25. – P.15069 – 15073.
13. Belhassen L., Feron O., Kaye D.M. et al. Regulation by cAMP of post – translational processing and subcellular targeting of endothelial nitric-oxide synthase (type 3) in cardiac myocytes // J. Biol. Chem. – 1997. – 272, N17. – P.11198 – 11204.

14. Benjafeld A.V., Morris B.J. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension // *Amer. J. Hypertens.* – 2000. – **13**, N9. – P.994 – 998.
15. Bennett M.R., Macdonald K., Chan S.W. et al. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques // *Circulat. Res.* – 1998. – **82**, N6. – P.704 – 712.
16. Billcke S.S., Bender A.T., Kanelakis K.C. et al. Hsp90 is required for heme binding and activation of apo-neuronal nitric oxide synthase: geldanamycin-mediated oxidant generation is unrelated to any action of Hsp90 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N23. – P.20504 – 20509.
17. Brouet A., Sonveaux P., Dessy C. et al. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins // *Circulat. Res.* – 2001. – **89**, N10. – P.866 – 873.
18. Campbell B., Adams J., Shin Y.K., Lefer A.M. Cardio-protective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1999. – **31**, N2. – P.467 – 476.
19. Chen W., Srinivasan S.R., Elkasabany A. et al. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study // *Amer. J. Hypertens.* – 2001. – **14**, N10. – P.1046 – 1052.
20. Chu Y., Heistad D.D., Knudtson K.L. et al. Quantification of mRNA for endothelial NO synthase in mouse blood vessels by real-time polymerase chain reaction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – **22**, N4. – P.611 – 616.
21. 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**, N6. – P.525 – 528.
22. Drummond G.R., Cai H., Davis M.E. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide // *Circulat. Res.* – 2000. – **86**, N3. – P.347 – 354.
23. Du X.L., Edelstein D., Dimmeler S. et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site // *J. Clin. Invest.* – 2001. – **108**, N9. – P.1341 – 1348.
24. Duplain H., Burcelin R., Sartori C. et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase // *Circulation.* – 2001. – **104**, N3. – P.342 – 345.
25. Fairchild T.A., Fulton D., Fontana J.T. et al. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298) → Asp variant of human endothelial nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N28. – P.26674 – 26679.
26. Felley-Bosco E., Bender F.C., Courjault-Gautier F. et al. Caveolin-1 downregulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P.14334 – 14339.
27. Feron O., Dessy C., Opel D.J. et al. Modulation of the endothelial nitric oxide synthase – caveolin interaction in cardiac myocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**, N46. – P.30249 – 30254.
28. Freedman J.E., Sauter R., Battinelli E.M. et al. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene // *Circulat. Res.* – 1999. – **84**, N12. – P.1416 – 1421.
29. 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. Therap.* – 2001. – **299**, N3. – P.818 – 824.
30. Furchgott R.F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle // *Circulat. Res.* – 1983. – **53**. – P.557 – 573.
31. Furchgott R.F. Studies on endothelium-dependent vasodilatation and the endothelium-derived relaxing factor // *Acta Physiol. Scand.* – 1990. – **139**. – P.157 – 270.
32. Garcia-Cardena G., Martasek P., Masters B. et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase and caveolin // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N41. – P.25437 – 25440.
33. Gardemann A., Lohre J., Cayci S. et al. The T allele of the missense Glu(298)Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile // *Atherosclerosis.* – 2002. – **160**, N1. – P.167 – 175.
34. Geng Y.J. Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis // *Heart and Vessels.* – 1997, Suppl 12. – P.76 – 80.
35. Govers R., Rabelink T.J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2001. – **280**, N2. – P.193 – 206.
36. 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**, N4. – P.235 – 241.
37. 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**, N2. – P.130 – 137.
38. Hannon G.J. RNA interference // *Nature.* – 2002. – **418**. – P.244 – 251.
39. Hara K., Kobayashi N., Watanabe S. et al. Effects of quinapril on expression of eNOS, ACE, and AT1 receptor in deoxycorticosterone acetate – salt hypertensive rats // *Amer. J. Hypertens.* – 2001. – **14**, N4, Pt1. – P.321 – 330.

40. Hibi K., Ishigami T., Tamura K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction // *Hypertension*. – 1998. – **32**, N3. – P.521 – 526.
41. 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**, N14. – P.1515 – 1520.
42. Hwang J.J., Tsai C.T., Yeh H.M. et al. The 27-bp tandem repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene is not associated with coronary artery disease in a hospital-based Taiwanese population // *Cardiology*. – 2002. – **97**, N2. – P.67 – 72.
43. Jachymova M., Horky K., Bultas J. et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **284**, N2. – P.426 – 430.
44. Kajiyama N., Saito Y., Miyamoto Y. et al. Lack of association between T-786 → C mutation in the 5' flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension // *Hypertens. Res.* – 2000. – **23**, N6. – P.561 – 565.
45. Karvonen J., Kauma H., Kervinen K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort // *J. Intern. Med.* – 2002. – **251**, N2. – P.102 – 110.
46. Kim Y.M., Bombeck C.A., Billiar T.R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis // *Circulat. Res.* – 1999. – **84**. – P.253 – 256.
47. Kishi T., Hirooka Y., Sakai K. et al. Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release // *Hypertension*. – 2001. – **38**, N4. – P.896 – 901.
48. Kojda G., Cheng Y.C., Burchfield J., Harrison D.G. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene // *Circulation*. – 2001. – **103**, N23. – P.2839 – 2844.
49. Krichevsky A.M., Kosik K.S. RNAi functions in cultured mammalian neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – **99**. – N18. – P. 11926 – 11929.
50. Kubota I., Han X., Opel D.J. et al. Increased susceptibility to development of triggered activity in myocytes from mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2000. – **32**, N7. – P.1239 – 1248.
51. Lacolley P., Gautier S., Poirier O. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects // *J. Hypertens.* – 1998. – **16**, N1. – P.31 – 35.
52. Laufs U., Gertz K., Huang P. et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice // *Stroke*. – 2000. – **31**, N10. – P.2442 – 2449.
53. Laufs U., Liao J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**, N37. – P.24266 – 24271.
54. Leeson C.P.M., Hingorani A.D., Mullen M.J. et al. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function // *Circulat. Res.* – 2002. – **90**. – P.1153 – 1158.
55. Lembo G., De Luca N., Battagli C. et al. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis // *Stroke*. – 2001. – **32**, N3. – P.735 – 740.
56. Liu J., Garcia-Cardena G., Sessa W.C. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme // *Biochemistry*. – 1995. – **34**, N38. – P.12333 – 12340.
57. 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**, N6. – P.528 – 529.
58. Loke K.E., Messina E.J., Shesely E.G. et al. Potential role of eNOS in the therapeutic control of myocardial oxygen consumption by ACE inhibitors and amlodipine // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – **49**, N1. – P.86 – 93.
59. Markus H.S., Ruigrok Y., Ali N., Powell J.F. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma // *Stroke*. – 1998. – **29**, N9. – P.1908 – 1911.
60. Matsushita H., Chang E., Glassford A.J. et al. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization // *Circulat. Res.* – 2001. – **89**, N9. – P.793 – 798.
61. Michel J.B., Feron O., Sase K. et al. Caveolin versus Calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N41. – P.25907 – 25912.
62. Michel J.B., Michel T. The role of palmitoyl-protein thioesterase in the palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase // *FEBS Lett.* – 1997. – **405**, N3. – P.356 – 362.
63. Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1999. – **32**, N11. – P.1361 – 1366.
64. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension // *Hypertension*. – 1998. – **32**, N1. – P.3 – 8.
65. Miyamoto Y., Saito Y., Nakayama M. et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T → C mutation associated with coronary spastic angina // *Hum Mol. Genet.* – 2000. – **9**, N18. – P.2629 – 2637.

66. Moibenko A.A., Brovkovich V.M., Kotsuruba A.I. et al. Nitric oxide and myocardial ischemia // *J. Mol. and Cell Cardiol.* – 1999. – **31**, N6. – A52.
67. Moibenko A.A., Yuzkiv M.Ya., Datsenko V.V. et al. Vascular mechanisms for compensation of the disturbances related to acute myocardial infarction: the role of nitric oxide // *J. Mol. and Cell Cardiol.* – 2001. – **33**, N6. – A.77.
68. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, an pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – **43**. – P.109 – 142.
69. Naber C.K., Baumgart D., Altmann C. et al. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2001. – **281**, N5. – P.1908 – 1912.
70. Nakagami H., Ikeda U., Maeda Y. et al. Coronary artery disease and endothelial nitric oxide synthase and angiotensin – converting enzyme gene polymorphisms // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 1999. – **8**, N3. – P.191 – 195.
71. 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. – **99**. – P.2864 – 2870.
72. 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**, N6. – P.628 – 634.
73. 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. – **22**, N4. – P.605 – 610.
74. 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**, N4. – P.586 – 589.
75. Novoradovsky A., Brantly M.L., Waclawiw M.A. et al. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in $\alpha 1$ – antitrypsin deficiency // *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1999. – **20**. – P.441 – 447.
76. Paradossi U., Colombo M.G., Andreassi M.G. et al. Evidence for association of a common variant of the endothelium nitric oxide synthase gene (Glu298 – Asp polymorphism) to the presence, extent and severity of coronary artery disease in the Italian population // VI International Learning Meeting (Bologna, Italy; May 30 – 31, June 1, 2002). – P.96.
77. 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**, N1. – P.65 – 70.
78. Petit F., Jarrousse A.S., Dahlmann B. et al. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation // *Biochem. J.* – 1997. – **326**, Pt 1. – P.93 – 98.
79. 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**, N24. – P.3096 – 3098.
80. Piacentini L., Karliner J.S. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart // *Pharmacology and Therapeutics.* – 1999. – **83**. – P.21 – 37.
81. Pouch M.N., Petit F., Buri J. et al. Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**, N37. – P.22023 – 22028.
82. Pulkkinen A., Viitanen L., Kareinen A. et al. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease // *J. Mol. Med.* – 2000. – **78**, N7. – P.372 – 379.
83. Rakhit A., Maguire C.T., Wakimoto H. et al. In vivo electrophysiologic studies in endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient mice // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2001. – **12**, N11. – P.1295 – 1301.
84. Razani B., Engelman J.A., Wang X.B. et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, N41. – P.38121 – 38138.
85. Sakai K., Hirooka Y., Matsuo I. et al. Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo // *Hypertension.* – 2000. – **36**, N6. – P.1023 – 1028.
86. Schneider M.P., Erdmann J., Delles C. et al. Functional gene testing of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase // *J. Hypertens.* – 2000. – **18**, N12. – P.1767 – 1773.
87. Searles C.D., Miwa Y., Harrison D., Ramasamy S. Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth // *Circulat. Res.* – 1999. – **85**. – P.588 – 595.
88. Shah V., Wiest R., Garcia-Cardena G. Et al. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**. – G463 – G468.
89. Shaul P.W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location // *Ann. Rev. Physiol.* – 2002. – **64**. – P.749 – 774.
90. Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J. et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveole // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**, N11. – P.6518 – 6522.
91. Sheehy A.M., Burson M.A., Black S.M. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide // *Amer. J. Physiol.* – 1998. – **274**, N5, Pt 1. – P.833 – 841.
92. Shi Y., Baker J.E., Zhang C. et al. Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation // *Circulat. Res.* – 2002. – **91**. – P.300 – 306.
93. Shimasaki Y., Yasue H., Yoshimura M. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the

- endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 1998. – **31**, N7. – P.1506 – 1510.
94. Shiojima I., Walsh K. Role of akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis // *Circulat. Res.* – 2002. – 90. – P.1243 – 1250.
 95. Shoji M., Tsutaya S., Saito R. et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan // *Life Sci.* – 2000. – 66, N26. – P.2557 – 2562.
 96. Shoji M., Yasujima M. Endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension // *Nippon Rinsho.* – 2000. – **58**, Suppl.1. – P.570 – 573.
 97. Sigusch H.H., Surber R., Lehmann M.H. et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2000. – **60**, N3. – P.229 – 235.
 98. Sowa G., Liu J., Papapetropoulos A. et al. Trafficking of endothelial nitric – oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N32. – P.22524 – 22531.
 99. Stangl K., Cascorbi I., Laule M. et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease // *Pharmacogenetics.* – 2000. – **10**, N2. – P.133 – 140.
 100. Takaoka M., Okamoto H., Ito M. Et al. Anti-hypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats // *Life Sci.* – 1998. – **63**, N4 – PL65 – 70.
 101. 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. – **12**, N5. – P.407 – 413.
 102. 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**, N8. – P.719 – 725.
 103. Tesauro M., Thompson W.C., Rogliani P. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**, N6. – P.2832 – 2835.
 104. Thom S.R., Bhopale V., Fisher D. et al. Stimulation of nitric oxide syntase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen: an oxidative stress response // *J. Neurobiol.* – 2002. – **51**, N2. – P.85 – 100.
 105. Tsujita Y., Baba S., Yamauchi R. et al. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study // *J. Hypertens.* – 2001. – **19**, N11. – P.1941 – 1948.
 106. 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**, N11. – P.736 – 740.
 107. 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**, N5. – P.1 – 4.
 108. Wang X., Abdel-Rahman A.A. Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2002. – **282**, N6. – P.2309 – 2315.
 109. Wang X.L. Cigarette smoking, DNA variants in endothelial nitric oxide synthase gene and vascular disease // *Contrib. Nephrol.* – 2000. – **130**. – P.53 – 67.
 110. 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**, N1. – P.41 – 45.
 111. 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**, N1. – P.45 – 50.
 112. Yasujima M., Tsutaya S., Shoji M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertension // *Rinsho Byori.* – 1998. – 46, N12. – P.1199 – 1204.
 113. Ying W – Z., Xia H., Sanders P.W. Nitric oxide synthase mutation in Dahl/Rapp rats decrease enzyme stability // *Circulat. Res.* – 2001. – **89**, N4. – P.317 – 322.
 114. 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. – **46**, N10. – P.1626 – 1630.
 115. 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. Cardiol.* – 2000. – **85**, N6. – P.710 – 714.
 116. 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**, N1. – P.65 – 69.
 117. 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. – **48**, N5. – P.367 – 374.
 118. Zhuo J.L., Mendelsohn F.A., Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease // *Hypertension.* – 2002. – **39**, N2, Pt2. – P.634 – 638.

Матеріал надійшов до редакції 21.10.2002