

Влияние полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтетазы 4a4b на состояние сердечно-сосудистой системы при тиреотоксикозе болезни Грейвса

Д.А. Попкова, А.Ю. Бабенко

ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий»

Попкова Д.А. — очный аспирант Института Эндокринологии ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», врач-эндокринолог отделения эндокринологии № 1; Бабенко А.Ю. — ведущий научный сотрудник ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», кандидат медицинских наук.

Контактная информация: ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», пр. Пархоменко, д. 15, Санкт-Петербург, Россия, 194156. Тел./факс: 8 (812) 702–37–38. E-mail: dashap83@mail.ru (Попкова Дарья Александровна).

Резюме

Актуальность. Оксид азота, синтезируемый эндотелиальной NO-синтетазой, играет важную роль в регуляции функции эндотелия и контроле артериального давления, частоты сердечных сокращений. **Цель исследования** — изучить связь полиморфизма интрона 4a4b гена эндотелиальной NO-синтетазы с уровнем артериального давления, частотой сердечных сокращений у пациентов с тиреотоксикозом болезни Грейвса. **Материалы и методы.** Мы определили полиморфизм гена eNOS 4a4b с помощью полимеразной цепной реакции у 164 пациентов с клиническим тиреотоксикозом и без сопутствующей соматической патологии. Всех пациентов мы разделили на три группы, сопоставимые по полу, возрасту, уровню тиреоидных гормонов: группа 1 состояла из пациентов с полиморфизмом eNOS 4b4b (n = 111), группа 2 — из пациентов с полиморфизмом eNOS 4a4b (n = 46), группа 3 — из пациентов с полиморфизмом eNOS 4a4a (n = 7). Мы определили уровень артериального давления и частоту сердечных сокращений до и после терапии β-адреноблокаторами и ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента в течение трех недель. **Результаты.** 4a4b полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтетазы коррелирует с уровнем артериального давления, частотой сердечных сокращений. До лечения артериальное давление, частота сердечных сокращений были достоверно выше в группе 1, чем у пациентов третьей группы. После терапии артериальное давление, частота сердечных сокращений значительно снизились в группе 3 по сравнению с данными показателями у больных первой и второй групп. **Выводы.** Наличие аллеля b эндотелиальной NO-синтетазы предрасполагает к развитию дисфункции эндотелия сосудов.

Ключевые слова: тиреотоксикоз, сердечно-сосудистые осложнения, эндотелиальная NO-синтаза.

Impact of endothelial nitric oxide synthase gene 4a4b polymorphism on cardiovascular system in patients with Graves' disease and thyrotoxicosis

D.A. Popkova, A.U. Babenko

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 15 Parhomenko av., St Petersburg, Russia, 194156. Phone: 8 (812) 702–55–68. E-mail: dashap83@mail.ru (Darya Popkova, postgraduate student).

Abstract

Background. Nitric oxide synthesized by endothelial nitric oxide synthase plays an important role in endothelial function regulation as well as in blood pressure and heart rate control. **Objective.** To assess the association between eNOS gene polymorphism intron 4a/4b and hypertension development, tachycardia in patients with clinical thyrotoxicosis. **Design and methods.** The eNOS gene polymorphisms were examined by polymerase chain reaction. We compared eNOS gene polymorphism 4a4b in 164 patients with clinical thyrotoxicosis. All patients were divided into three groups matched by sex, age, level thyroid hormones: group 1 included patients with eNOS 4b4b polymorphism (n = 111), group 2 — patients with eNOS 4a4b polymorphism (n = 46), group 3 — patients with eNOS 4a4a polymorphism (n = 7). Blood pressure and heart rate were assessed before and after 3-week treatment with β-blocker and angiotensin converting enzyme inhibitors. **Results.** The eNOS 4a4b polymorphism gene correlates with blood pressure level and heart rate. Before treatment blood pressure and heart rate were significantly higher in group 1 than in group 3. After treatment blood pressure and heart rate were significantly lower in group 3 in comparison with groups 1 and 2. **Conclusion.** Our results demonstrate that eNOS polymorphism allele b predisposes to the development of endothelial dysfunction.

Key words: thyrotoxicosis, cardiovascular complication, endothelial nitric oxide synthase.

Статья поступила в редакцию: 25.11.09. и принята к печати: 09.12.09.

Введение

Оксид азота (Nitric Oxide, NO) — основной эндотелиальный фактор релаксации, поддерживающий нормальный тонус сосудистой стенки за счет расслабления гладкомышечной мускулатуры сосудов. NO синтезируется в разных тканях из L-аргинина с помощью семейства ферментов NO-синтаз.

Известны 3 основных типа NO-синтаз, ответственных за синтез оксида азота в различных тканях: 1 тип — NO-синтаза нервной ткани (nNOS); 2 тип — «индуцибельная» NO-синтаза (iNOS), синтезирующаяся в клетках сосудистой стенки и макрофагах только при патологии, например, при воспалении, и 3 тип — эндотелиальная NO-синтаза (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), участвующая в синтезе оксида азота эндотелием и посредством этого — в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления (АД). Функция оксида азота заключается в угнетении пролиферации гладкомышечных клеток, уменьшении агрегации тромбоцитов, а также замедлении адгезии лейкоцитов к эндотелию [1–3]. При недостатке оксида азота в крови развивается спазм сосудов, в том числе и коронарных. Длительная недостаточность вазодилатации может приводить к развитию артериальной гипертензии, тахикардии.

Человеческий eNOS ген состоит из 26 экзонов. Изучено 4 полиморфизма гена eNOS: в интроне 18 — локус A27C; в интроне 23 — локус G10T; в интроне 4 — eNOS 4a4b; в экзоне 7 — Glu298Asp. Полиморфизм в интроне 4 обусловлен наличием разного количества повторов фрагментов bp, состоящих из 27 нуклеотидов: фрагмента b, в котором имеются 5 таких повторов, и фрагмента a, где их 4 [1]. Данный полиморфизм не является структурным, но, возможно, оказывает влияние на активность образования NO. В мире проведено много работ по изучению полиморфизма гена eNOS 4a4b. Исследование A. Benjafeld et al. (2000) показало, что aa генотипу соответствует максимальный уровень базального NO, у людей с bb генотипом уровень NO был в 2 раза ниже, а гетерозиготы занимали промежуточное положение по уровню базального NO [2].

Известно, что для тиреотоксикоза характерно повышение систолического АД и тахикардия. Между тем изменение уровня АД, частоты сердечных сокращений (ЧСС) у разных больных весьма вариабельно и не всегда коррелирует с уровнем тиреоидных гормонов. Причины такой вариабельности до сих пор остаются не изученными. Можно предположить, что одним из факторов, влияющих на степень изменения АД и выраженности тахикардии, является активность eNOS и содержание базального уровня оксида азота в крови.

На фоне тиреотоксикоза возникает изменение функций сосудистого эндотелия. Роль полиморфизма 4a4b у больных тиреотоксикозом до сих пор не изучена. Можно предположить, что полиморфизм гена eNOS 4a4b, влияя на активность выработки оксида азота эндотелием, по крайней мере частично, определяет гетерогенность указанных клинических и лабораторных изменений.

Цель исследования

Цель настоящей работы — оценить связь полиморфизма гена eNOS 4a4b с уровнем АД и ЧСС у пациентов с тиреотоксикозом болезни Грейвса.

Материалы и методы

Мы обследовали 164 человека. Критериями включения в исследование являлось наличие клинического тиреотоксикоза, отсутствие клинически значимой сопутствующей соматической патологии (ишемической болезни сердца (ИБС) и/или указание на ИБС в анамнезе), возраст от 18 до 58 лет (средний возраст составил $42 \pm 0,7$ года). У всех пациентов были клинические проявления тиреотоксикоза: увеличение размеров щитовидной железы, тахикардия — средняя ЧСС $96,4 \pm 1,7$ удара в минуту; повышение среднего систолического АД $130,6 \pm 1,4$ мм рт. ст., а также были уровни тиреоидных гормонов (уровень свободного трийодтиронина (Т3св.) $12,3 \pm 1,07$ пмоль/л; свободного тироксина (Т4св.) — $36,9 \pm 1,9$ пмоль/л; тиреотропного гормона (ТТГ) — $0,0402 \pm 0,0052$ мМЕ/л).

Объективное обследование проводилось дважды: в начале исследования измерялось систолическое (АДс) и диастолическое (АДд) АД, ЧСС за одну минуту, уровень тиреоидных гормонов. Эти же параметры исследовались через 3 недели, в течение которых все пациенты получали тиреостатическую и симптоматическую терапию (β -адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента [ИАПФ]) в течение трех недель. Измерение АД проводилось с помощью аппарата Короткова в положении сидя, после 5 минут отдыха, при первом обследовании на левой и правой руке, а для анализа использовались цифры АД, полученные при измерении на той руке, на которой АД было выше, и при повторном обследовании измерение АД проводилось именно на этой руке. Уровень гормонов оценивался иммуноферментным методом дважды (нормальные уровни гормонов соответствовали ТТГ $0,17 \pm 4,1$ мМЕ/л; Т4св. — $10,0 \pm 25,0$ пмоль/л; Т3св. — $2,2 \pm 6,4$ пмоль/л).

Выделение ДНК из крови для полимеразной цепной реакции

Для выделения ДНК из лимфоцитов из периферической крови использовали модифицированный метод [6]. В пластиковую пробирку, содержащую Na2ЭДТА (pH = 8,0) в качестве антикоагулянта, забирали кровь самотеком из локтевой вены в необходимом количестве. Кровь перемешивали в пробирке для предотвращения образования тромбов.

К 0,5 мл цельной крови добавляли 1 мл стерильной дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали 2 минуты при 10000 об./мин. Полученный осадок дважды ресуспендировали и отмывали в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Полученный осадок растворяли в 0,2 мл буфера для протеиназы К (20 mM Tris-HCl; pH = 8,0; 10 mM ЭДТА и 150,0 mM NaCl). После этого добавляли буфер с додецилсульфатом натрия (sodium dodecyl sulphate, SDS) до 1 % и протеиназу К

до конечной концентрации 250 мг/мл в растворе. Смесь инкубировали в течение 16 часов при 56 °С. Экстракцию белков проводили, добавив равный объем смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 1:1:24 и центрифугировали 10 минут при 10000 оборотах в минуту. К полученной водной фазе добавляли 2–2,5 объема охлажденного 96 % этанола. Полученный осадок ДНК промывали охлажденным 70 % этанолом, просушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл стерильного ТЕ буфера (10 mM Tris-HCl; pH = 8,0; 0,5 mM ЭДТА). Качество выделенной ДНК и ее приблизительную концентрацию оценивали с помощью электрофореза в 0,7 % растворе агарозы.

4a4b полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы

Этот полиморфизм обусловлен разным количеством 27-нуклеотидных повторов в четвертом интроне гена eNOS [7]. В норме их бывает пять (4b-аллель), а при мутации — четыре (4a-аллель).

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) анализируемого участка гена eNOS были выбраны следующие праймеры:

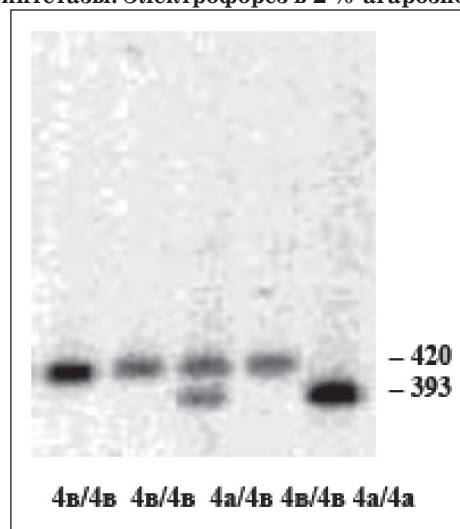
F — 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3'

R — 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'.

30 циклов амплификации проводились в конечном объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг геномной ДНК, 1 пмоль каждого праймера, 10mM Tris-HCl pH 8,4, 1,2 mM, MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM каждого dNTP и одну единицу Taq полимеразы. ПЦР включала денатурацию при 92 °С в течение 45 секунд, отжиг при 56 °С в течение 45 секунд и синтез при 72 °С также в течение 45 секунд.

Для генотипирования eNOS продукты ПЦР анализировались в 2 % агарозном геле. При комбинации аллелей формируются три генотипа: 4b4b — 393 п. н., 4a4b — 393 п. н., 420 п. н., 4a4a — 420 п. н. (рис. 1).

Рисунок 1. 4a4b полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы. Электрофорез в 2 % агарозном геле



Статистическая обработка, корреляционный и многофакторный анализ данных выполнялись на компьютере Toshiba, Portege 7200 с использованием программ Excel 2000. Учитывая объем выборки ($n > 30$) и нормальное распределение показателей использовались параметрические методы статистики (t критерий Стьюдента). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Мы определили генотип у каждого из 164 пациентов и разделили всех больных на три группы: в первую группу вошли пациенты с 4b4b генотипом ($n = 111$) — 68 %, во вторую группу — пациенты с 4a4b генотипом ($n = 46$) — 28 %, в третью группу — пациенты с 4a4a генотипом ($n = 7$) — 4 %. По данным литературы, в Европейской белой популяции b аллель является более распростра-

Таблица 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИМ ТИРЕОТОКСИКОЗОМ И ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТЕАЗЫ 4A4B

	eNOS 4b4b	eNOS 4a4b	eNOS 4a4a	p
n (%)	111 (68 %)	46 (28 %)	7 (4 %)	
Возраст (лет)	42,2 ± 0,86	42,3 ± 1,3	46 ± 3,87	0,98
Пол (жен./муж.)	97:14	37:9	7:0	
ЧСС в начале исследования (уд. в мин.)	99,6 ± 2*	92 ± 2,8*	77,6 ± 8,2*	0,003
АДс в начале исследования (мм рт. ст.)	132 ± 1,7*	130 ± 2,5*	123,3 ± 6,2*	0,001
АДд в начале исследования (мм рт. ст.)	78 ± 0,9*	75,6 ± 1,5	72,5 ± 4,03*	0,022
Т3св. в начале исследования (ммоль/л)	11,2 ± 0,83	12,8 ± 2,11	12,7 ± 1,5	0,345
Т3св. 2	5,8 ± 0,8	6,9 ± 1,65	4,95 ± 1,25	0,566
Т4св. в начале исследования (ммоль/л)	36,1 ± 2,14	35,83 ± 3,7	33,4 ± 1,8	0,871
Т4св. 2	15,48 ± 1,6	16,8 ± 2,05	15,2 ± 0,8	0,654
ТТГ в начале исследования (ммоль/л)	0,0417 ± 0,007	0,0428 ± 0,0078	0,042 ± 0,0062	0,71
Процент больных, получающих ИАПФ	17,5 %*	32,5 %*	45 %*	0,02
Процент больных, получающих бета-адреноблокаторы	74,4 %*	83,1 %*	66,6 %*	0,025

Примечание: АДс — систолическое артериальное давление; АДд — диастолическое артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений; Т3св. — свободный трийодтиронин; Т4св. — свободный тироксин; ТТГ — тиреотропный гормон; ИАПФ — ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента; eNOS — эндотелиальная NO-синтаза; * — значимые различия между группами пациентов с разным полиморфизмом eNOS 4b4b и ЧСС в начале исследования; АДс и АДд в начале исследования; числом больных, получающих ИАПФ, бета-адреноблокаторы ($p < 0,05$, t критерий Стьюдента).

Таблица 2

ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ОТ ГЕНОТИПА ENOS 4A4B

ЧСС (уд. в мин.)	полиморфизм eNOS 4b4b (n = 111)	полиморфизм eNOS 4a4b (n = 46)	полиморфизм eNOS 4a4a (n = 7)	p
ЧСС в начале исследования	99,6 ± 2	92 ± 2,8	77,6 ± 8,2*	0,003
ЧСС после 3 недель терапии	77,5 ± 1,4	80 ± 2,7	74 ± 1,3	0,98
ЧСС через год от начала исследования	78 ± 2,4	74,5 ± 3,8	65 ± 3,2*	0,02

Примечание: ЧСС — частота сердечных сокращений; eNOS — эндотелиальная NO-синтетаза; * — значимые различия между группами пациентов с разным полиморфизмом eNOS 4a4b по ЧСС в начале исследования и через год от начала исследования ($p < 0,05$, t критерий Стьюдента).

ненным, в то время как а аллель является мутантным и встречается реже. Распределение частот аллелей в популяции составляет соответственно bb — 0,41; ab — 0,46; aa — 0,13 [1]. Таким образом, по сравнению с распределением в здоровой популяции у больных с тиреотоксикозом болезни Грейвса значительно чаще встречается аллель b.

В таблице 1 приведена клиническая характеристика трех групп пациентов и данные лабораторного обследования. Достоверных различий по полу, возрасту, уровню тиреоидных гормонов (Т3св., Т4св., ТТГ) между группами на момент начала исследования не было, группы больных были однородны ($p < 0,05$) (табл. 1).

При анализе полученных результатов отмечена достоверная корреляционная зависимость между ЧСС и 4a4b полиморфизмом гена eNOS (коэффициент корреляции $r = 0,1983$; $p = 0,003$). Уровень тиреоидных гормонов достоверно не отличался в трех группах, однако тахикардия была достоверно более выражена у больных в группе 1 (носителей 4b4b генотипа) — средняя ЧСС 100 ± 2 уд./мин., а в группе 3 (гаплотип 4a4a) — 78 ± 8 уд./мин. ($p = 0,003$). На фоне симптоматической и анти-тиреоидной терапии ЧСС уменьшилась у всех пациентов, однако через год от начала наблюдения в группе пациентов с 4a4a генотипом снижение ЧСС было достоверно более значимым ($p = 0,02$) (табл. 2).

Для больных тиреотоксикозом характерен подъем систолического АД. У пациентов с 4a4a генотипом при тиреотоксикозе уровень систолического и диастолического АД достоверно ниже (АДс = $123,3 \pm 6,2$; АДд = $72,5 \pm 4,03$ мм рт. ст.), чем у больных с 4b4b генотипом (АДс = $132 \pm 1,7$; АДд = $78 \pm 0,9$ мм рт. ст.), уровень АД у больных с 4a4b генотипом имеет промежуточное значение

(АДс = $130 \pm 2,5$; АДд = $75,6 \pm 1,5$ мм рт. ст., $p = 0,001$; $p = 0,022$ соответственно). Систолическое и диастолическое АД снизилось на фоне терапии во всех трех группах, тем не менее более значимо уровень АД понизился в группе больных с 4a4a генотипом. В третьей группе пациентов АДс после трех недель терапии составило $115 \pm 4,2$ мм рт. ст., АДд после трех недель терапии — $68,3 \pm 3,07$ мм рт. ст., тогда как в первой группе АДс после трех недель терапии составило $120,6 \pm 1,5$ мм рт. ст., а АДд — $72,5 \pm 0,8$ мм рт. ст., а во второй группе после терапии АДс составило $121 \pm 2,3$ мм рт. ст., а АДд — $70 \pm 1,64$ мм рт. ст.; $p = 0,65$; $p = 0,79$ соответственно (табл. 3).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют, что полиморфизм гена eNOS может оказывать влияние на выраженность некоторых клинических проявлений (ЧСС, уровень АД) у пациентов с тиреотоксикозом болезни Грейвса. У больных, имевших вариант генотипа 4a4a, отмечалось наименьшее увеличение ЧСС и уровня АД в ответ на воздействие избытка тиреоидных гормонов. Таким образом, гаплотип 4a4a можно рассматривать как протекторный, уменьшающий токсическое воздействие избытка Т3 на сердечно-сосудистую систему при тиреотоксикозе.

На фоне симптоматической и анти-тиреоидной терапии ЧСС уменьшилась у всех пациентов, однако через год от начала наблюдения в группе пациентов с полиморфизмом eNOS 4a4a снижение ЧСС было достоверно более значимым (ЧСС ср. = $99,6 \pm 2$ уд./мин. — первая группа пациентов, а в группе 3 (гаплотип 4a4a) — ЧСС ср. = $77,6 \pm 8,2$ уд./мин., $p = 0,02$), несмотря на то, что бета-адреноблокаторы получало значительно меньшее число больных третьей группы (66,6 %), по сравнению с больными-носителями аллеля b (при гаплотипе 4b4b — 74,4 %, 4a4b — 83,1 %, $p = 0,025$).

Таблица 3

ДИНАМИКА АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ENOS 4A4B

АД (мм рт. ст.)	eNOS 4b4b (n = 111)	eNOS 4a4b (n = 46)	eNOS 4a4a (n = 7)	p
АДс в начале исследования	132 ± 1,7	130 ± 2,5	123,3 ± 6,2*	0,001
АДс после 3 недель терапии	120,6 ± 1,5	121 ± 2,26	115 ± 4,2	0,65
АДд в начале исследования	78 ± 0,9	75,6 ± 1,5	72,5 ± 4,03*	0,022
АДд после 3 недель терапии	72,5 ± 0,8	70 ± 1,64	68,3 ± 3,07	0,79

Примечание: АДс — систолическое артериальное давление; АДд — диастолическое артериальное давление; * — значимые различия между группами пациентов с разным полиморфизмом eNOS 4a4b по АДс и АДд в начале исследования, после трех недель терапии ($p < 0,05$, t критерий Стьюдента).

Все пациенты с артериальной гипертензией получали терапию ИАПФ, однако достоверно большее число больных с полиморфизмом eNOS 4a4a получали препараты группы ИАПФ (45 %), по сравнению с больными из других групп (в первой группе ИАПФ получали 17,5 % пациентов, а среди гетерозигот терапию ИАПФ получали лишь 32,5 % больных, $p = 0,02$). Так как ИАПФ влияют на функцию эндотелия, обладают гипотензивным эффектом, более выраженное снижение АД на фоне терапии у пациентов с полиморфизмом eNOS 4a4a может быть, в частности, обусловлено действием ИАПФ.

Выводы

1. Уровни систолического и диастолического АД, ЧСС при тиреотоксикозе достоверно выше у больных с генотипом eNOS 4b4b, чем у пациентов с генотипами eNOS 4a4b и 4a4a.
2. Систолическое и диастолическое АД, ЧСС на фоне терапии бета-адреноблокаторами и ИАПФ достоверно более значимо снизились в группе больных с генотипом 4a4a.
3. Аллель eNOS b предрасполагает к развитию дисфункции эндотелия сосудов и развитию артериальной гипертензии, синусовой тахикардии, в то время как аллель а является протекторным.

Литература

1. Минушкина Л.О. Гены эндотелиальных факторов и артериальная гипертензия // Новости кардиологии. — Февраль, 2007. — 5 с.
2. Benjafeld A., Morris B.J. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension // *Am. J. Hypertension*. — 2000. — Vol. 9, № 13. — P. 994–998.
3. Wang W., Wang S., Yan L. et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, № 22. — P. 16899–16903.
4. Iwata I., Honda H. Acute hyperthyroidism alters adrenoreceptor- and muscarinic receptor-mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries // *Eur. J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 493, № 1–3. — P. 191–199.
5. Honda H., Iwata T., Mochizuki T. et al. Changes in vascular reactivity by acute hyperthyroidism in isolated rat aortae // *Gen. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 34, № 6. — P. 429–434.
6. Hermenegildo C., Medina P., Peiró M. et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87, № 12. — P. 5636–5640.
7. Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // *Nucleic Acids Res.* — 1976. — Vol. 3, № 9. — P. 2303.
8. Taniwaki H., Ishimura E., Matsumoto N. et al. Relations between ACE gene and eNOS gene polymorphisms and resistive index in type 2 diabetic patients with nephropathy // *Diabetes Care*. — 2001. — Vol. 24, № 9. — P. 1653–1660.