

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СЕВЕРНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ФАКУЛЬТЕТ Медико-профилактического дела и медицинской биохимии  
КАФЕДРА медицинской биологии и генетики

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**  
**(специалиста)**

«Вазоактивные факторы у спортсменов с полиморфизмом -786Т>С гена  
эндотелиальной синтазы оксида азота»

Выполнил обучающийся группы 2	Афиногенова Оксана Анатольевна
Направление подготовки	30.05.01 Медицинская биохимия
Форма обучения	Очная
Руководитель	д.б.н., профессор, заведующая кафедрой медицинской биологии и генетики Бебякова Н.А.
Рецензент	к.б.н., доцент кафедры фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Псковский государственный университет» Командресова Т.М.
Оценка	

Архангельск, 2021

## Содержание

Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы	
1.1. Роль эндотелия в моделировании тонуса сосудов.....	9
1.2. Эндотелиальная дисфункция.....	15
1.3. Роль полиморфизма -786T>C гена NOS3 в развитии вазоконстрикции.....	17
1.4. Полиморфизм -786T>C гена NOS3 в профессиональном спорте.....	20
Глава 2. Материалы и методы	
2.1. База исследования.....	25
2.2. Материал и объем исследования.....	25
2.3. Методы исследования.....	26
Глава 3. Результаты и их обсуждение	
3.1. Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C в гене NOS3 среди молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, и профессиональных спортсменов.....	36
3.2. Анализ полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом.....	40
3.2.1. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с уровнем вазоактивных эндотелиальных факторов в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом.....	40
3.2.2. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом гемодинамической реакции на дозированную физическую нагрузку в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом.....	45
3.2.3. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом саморегуляции кровообращения в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом.....	47
3.3. Анализ полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе профессиональных спортсменов.....	48

3.3.1. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с уровнем вазоактивных эндотелиальных факторов в группе профессиональных спортсменов.....	48
3.3.2. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом гемодинамической реакции на дозированную физическую нагрузку в группе профессиональных спортсменов.....	52
3.3.3. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом саморегуляции кровообращения в группе профессиональных спортсменов.....	52
Заключение.....	54
Выводы.....	60
Практические рекомендации.....	62
Список литературы.....	63
Приложение 1.....	71
Приложение 2.....	73
Приложение 3.....	75

### **Список публикаций по теме исследования**

1. Афиногенова О.А. Полиморфизм -786Т>С гена NOS3 в развитии вазоконстрикции (обзор) // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации / сборник статей XXXVI Международной научно-практической конференции: в 2 ч. Пенза, 2020. - С. 38-44.
2. Афиногенова О.А. Полиморфизм -786Т>С гена NOS3 в профессиональном спорте (обзор литературы) // World science: problems and innovations / сборник статей XLV Международной научно-практической конференции. Пенза, 2020. - С. 18-23.
3. Афиногенова О.А., Бебякова Н.А. Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма -786Т>С гена NOS3 у профессиональных спортсменов - жителей Архангельской области // Тенденции развития науки и образования. - 2021. - №73-1. - С. 105-108.
4. Фадеева Н.А., Бебякова Н.А., Афиногенова О.А., Хромова А.В., Сумарокова А.В. Тонус сосудов у женщин с вариантом rs2070744 гена NOS3 // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2021. - Т.39. - № S1-2. - С. 53.

### **Публичное представление результатов исследования**

1. IX Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям», Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 15-19 марта 2021 г.
2. Итоговая научно-практическая конференция ординаторов СГМУ, секция «Будущие ординаторы», постерный доклад «Уровень вазоактивных факторов в плазме крови спортсменов с полиморфизмом -786Т>С гена эндотелиальной синтазы оксида азота», Архангельск, 26-28 мая 2021 г.

## Список сокращений и условных обозначений

АГ - артериальная гипертензия

АД - артериальное давление

АТ II - ангиотензин II

ГАУ АО - государственное автономное учреждение Архангельской области

ДАД - диастолическое артериальное давление

ДИ - доверительный интервал

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ - инфаркт миокарда

КМС - кандидат в мастера спорта

МС - мастер спорта

МСМК - мастер спорта международного класса

ОР - относительный риск

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РАС - ренин-ангиотензиновая система

САД - систолическое артериальное давление

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ССС - сердечно-сосудистая система

ТСК - тип саморегуляции кровообращения

ФГБОУ ВО - федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС - центральная нервная система

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭПФ - эндотелинпревращающий фермент

ЭТ-1 - эндотелин 1

ВН4 - тетрагидробиоптерин

NADH - никотинамидадениндинуклеотид

NO - оксид азота

NOS - синтаза оксида азота

## Введение

### Актуальность темы исследования

Перспективным подходом для выделения групп повышенного риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы является анализ полиморфизма генов-кандидатов. Одним из таких генов является ген синтазы оксида азота (NOS), а именно его эндотелиальная изоформа – NOS3. Ген NOS3 определяет выработку оксида азота в эндотелиоцитах, обеспечивая базальный тонус сосудов.

В настоящее время полиморфизмы гена NOS3 активно изучаются в качестве фактора риска развития таких заболеваний, как ревматоидный артрит [30], онкопатология различной локализации [29, 33, 43, 46, 56, 65], остеопороз [42], серповидно-клеточная анемия [39, 64], асцит при циррозе печени [63], мужское бесплодие [37]. Большое количество мировых исследований посвящено взаимосвязи полиморфизма гена NOS3 с развитием различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе с артериальной гипертензией [1, 47, 50, 53, 59, 60, 62]. Большая часть подобных исследований оценивает полиморфизм гена NOS3 как фактор риска развития ССЗ у людей с уже диагностированной кардиоваскулярной патологией. Данный факт не позволяет оценить перспективы использования полиморфизма гена NOS3 в качестве раннего маркера развития артериальной гипертензии, являющейся одной из ведущих причин инвалидности и смертности населения по всему миру.

Согласно демографическим данным на протяжении последних 20 лет зарегистрирован резкий рост специфической кардиальной патологии в спортивной среде. В некоторых западноевропейских странах показатель смертности от сердечно-сосудистых заболеваний среди спортсменов в 2,5 раза превышает его среднее значение для лиц, не занимающихся профессионально спортом. Основной причиной этого является патологическая трансформация «спортивного сердца». В процессе как физиологической, так и патологической трансформации «спортивного сердца» играют роль «гены

предрасположенности», реализующие свое отрицательное воздействие в экологически неблагоприятных условиях, включающих психофункциональные перегрузки и другие профессионально-спортивные факторы риска [13].

Поиск ранних факторов риска развития периферической вазоконстрикции, являющейся начальным предиктором артериальной гипертензии, определяет актуальность настоящей работы. Раннее выявление вазоконстрикции позволит проводить своевременные профилактические мероприятия по снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим значимыми являются исследования молодых людей с полиморфизмом гена NOS3 без выявленной кардиоваскулярной патологии с позиции изучения баланса вазоактивных факторов и вариабельности гемодинамических показателей, в том числе и разработка новых геноспецифических методов кардиопротекции в спорте.

#### **Цель исследования**

Выявить особенности формирования уровня вазоактивных факторов у профессиональных спортсменов с полиморфизмом -786T>C гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

#### **Задачи исследования**

1. Оценить распространенность генотипов и аллелей полиморфизма -786T>C гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) у молодых людей, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа), и профессиональных спортсменов.

2. Изучить взаимосвязь генотипов и аллелей полиморфизма -786T>C гена NOS3 с уровнем вазоактивных факторов в плазме крови профессиональных спортсменов и лиц, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа).

3. Исследовать взаимосвязь генотипов и аллелей полиморфизма -786T>C гена NOS3 с типом гемодинамической реакции на дозированную физическую нагрузку у профессиональных спортсменов и лиц, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа).

4. Сравнить тип саморегуляции кровообращения у профессиональных спортсменов и лиц, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа).

#### **Предмет и объект исследования**

Объектом исследования являются вазоактивные эндотелиальные факторы в плазме крови; предмет исследования – взаимосвязь вазоактивных эндотелиальных факторов с полиморфизмом -786T>C гена NOS3 у профессиональных спортсменов и лиц, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа).

#### **Гипотеза исследования**

Полиморфный аллель -786C и генотип -786C/C гена NOS3 у спортсменов и лиц контрольной группы оказывают разное влияние на формирование дисбаланса вазоактивных факторов в плазме крови и, как следствие, такого фактора риска АГ как гипертоническая реакция на физическую нагрузку.

#### **Научная новизна**

Установлено, что у лиц контрольной группы и профессиональных спортсменов – жителей Архангельской области частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 не отличается от таковой в европейской популяции. Выявлено, что наличие генотипа -786C/C гена NOS3 у лиц контрольной группы приводит к развитию эндотелиальной дисфункции с дисбалансом в сторону увеличения вазоконстрикторных факторов и формированием такого фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний, как гипертоническая реакция на физическую нагрузку. У спортсменов – носителей генотипа -786C/C ассоциации с эндотелиальной дисфункцией и гипертонической реакцией на нагрузку не установлено.

#### **Практическая значимость**

Результаты исследования вносят определенный вклад в формирование представлений о наследственных основах развития вазоконстрикции и особенностях функционирования генома человека, а также способствуют разработке новых профилактических программ, сохраняющих здоровье.



# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Роль эндотелия в моделировании тонуса сосудов

Одним из важнейших звеньев модуляции базального (миогенного) тонуса сосудов, сохраняющегося даже при выключении нервных и гуморальных влияний, является эндотелий – активный эндокринный орган, состоящий из однослойного пласта специализированных клеток – эндотелиоцитов.

К основным функциям эндотелия относят его участие в сбалансированной продукции регуляторных субстанций, обеспечивающих целостную работу сердечно-сосудистой системы. Эндотелиоциты принимают участие в таких процессах как моделирование тонуса сосудов, гемостаз, воспаление, рост и пролиферация клеток.

Поддержание тонуса сосудов осуществляется за счет выработки эндотелием вазоактивных факторов, приводящих к сужению сосудов и повышению их тонуса (вазоконстрикторы) либо к расширению сосудов и снижению их тонуса (вазодилататоры). К вазоконстрикторам, выделяемым эндотелием, относятся эндотелин-1, ангиотензин II, тромбоксан A<sub>2</sub>, реактивные формы кислорода и др.; к вазодилататорам – простациклин, простагландин, брадикинин, адреномедуллин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор, C-тип натрийуретического пептида и др. [8].

Одним из главных регуляторов поддержания тонуса сосудов является мощный эндотелиальный фактор расслабления – оксид азота (NO), повышающий проницаемость эндотелия, подавляющий адгезию тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, являющийся блокатором пролиферации гладкомышечных клеток и ингибитором окисления холестерина из фракции липопротеидов низкой плотности [19].

Оксид азота находится в крови человека 1-4 секунды, что доказывает его нестабильность с позиций термодинамики. Накопление NO в крови происходит за счет его метаболитов (нитритов, нитратов, тио- и перокси- производных), представленных в большем количестве и существующих в плазме от

нескольких минут до нескольких часов [15].

Описано 2 варианта выработки NO: базальный и стимулированный. Физиологические эффекты, такие как поддержание васкулярного тонуса и блокировка адгезии тромбоцитов и лейкоцитов на эндотелий сосудов обеспечиваются за счет базальной продукции NO. К веществам, способным усиливать синтез и секрецию оксида азота относят нейромедиаторы (норадреналин, ацетилхолин), макроэргические соединения (АТФ), медиаторы воспаления (гистамин, брадикинин). Кроме того, в стимуляции синтеза NO принимают участие гипоксия и динамическое напряжение мышечных компонентов васкулярной стенки.

Инициация выработки оксида азота в организме человека и млекопитающих происходит под действием фермента NO-синтазы (NOS). L-аргинин служит донором для образования продукта. В результате окислительных реакций его гуанидиновой группы синтезируется L-цитруллин и оксид азота [12].

Представлено 3 функциональных варианта фермента синтазы оксида азота: нейрональный (nNOS или NOS1), макрофагальный или индуцибельный (iNOS или NOS2) и эндотелиальный (eNOS или NOS3). К конститутивным (постоянно экспрессирующимся) разновидностям фермента относят NOS1 и NOS3. Базальную секрецию оксида азота обеспечивает изоформа NOS3 [12]. Выявлено, что сосуды малого диаметра в сравнении с крупными сосудами отличаются большим объемом синтеза оксида азота.

Реализация эффектов NO опосредована образованием «вторичного вестника» - циклического гуанозинмонофосфата. При увеличении количества данного мессенджера под действием оксида азота происходит уменьшение содержания кальция в гладкой мускулатуре и тромбоцитах благодаря распаду Ca-кальмодулинового комплекса и дальнейшему высвобождению Ca. цГМФ, путем активации цГМФ-зависимой протеинкиназы, опосредует открытие многочисленных ионных каналов. Наиболее значимы в данном процессе белковые K-Ca<sup>2+</sup> -каналы, имеющие высокую мембранную плотность.

Открытие этих каналов для калия опосредует релаксацию гладкой мускулатуры вследствие выхода К и Са из мышечной ткани в фазу реполяризации. Данный путь является основным механизмом действия оксида азота [6]. Выработка NO по Са- и кальмодулин независимому пути осуществляется при активации NOS2 фактором некроза опухоли альфа. При работе NOS2 выработка NO примерно в 1000 раз выше, чем при действии NOS1 и NOS3.

В определённых ситуациях, в частности при острой гипоксии или кровотечении, клетки эндотелия становятся «причиной» вазоконстрикции, как за счёт снижения продукции вазодилатирующего агента NO, так и вследствие многократно усиленной выработки веществ с вазоконстрикторным эффектом - эндотелинов - самых сильных вазоконстрикторов эндогенного происхождения.

Эндотелин-1 представляет собой большой бициклический полипептид, составленный из комбинации 21-ой аминокислоты. Кроме ЭТ-1, найдены две другие его изоформы - ЭТ-2 и ЭТ-3, отличающиеся между собой некоторыми вариациями в аминокислотной последовательности. ЭТ-1 чаще всего образуется в эндотелиальных клетках (в том числе, например, и в эндотелиоцитах молочных желез), но может образовываться и в гладкомышечных клетках сосудов, эндометрии, нейрональных клетках, астроцитах, тканевых базофилах, гепатоцитах, клетках Сертоли, мезангиоцитах. ЭТ-2 находят в почках, плаценте, кишечнике, миокарде, матке. ЭТ-3 обнаружен в легких, головном мозге, почках, пищеварительной системе [8, 21].

ЭТ-1 действует через паракринный механизм на рецепторы гладких мышц сосудов, вызывая их сокращение и рост, и аутокринно-паракринный механизм на эндотелиальные клетки, обеспечивая производство вазорелаксантов и рост-стимулирующих агентов, таких как NO и простаглицлин. ЭТ-1 не накапливается в клетках эндотелия, но мгновенно образуется под стимуляцией адреналином, ангиотензином-II, цитокинами, тромбином, антидиуретическим гормоном и механическими воздействиями. Период полураспада ЭТ-1 в плазме крови от 4 до 7 мин. Во время первого

прохождения через сосуды легких инактивируется до 90% общей доли ЭТ-1 [8].

Синтез ЭТ-1 запускается с неактивного полипептидного предшественника препроэндотелина, который посредством отщепления олигопептидных фрагментов превращается в «большой эндотелин» (В-эндотелин), включающий в себя 38 аминокислотных остатков. Далее, из «большого эндотелина» в результате ограниченного протеолиза, контролируемого эндотелинпревращающим ферментом, образуется сам ЭТ-1.

ЭПФ – представитель группы мембраносвязанных металлопротеиназ. Эти ферменты участвуют в процессинге многих пептидных гормонов и нейропептидов. Биологический синтез «открытых» эндотелинов происходит при гидролизе соответствующих «изопрещественников»: В-ЭТ-1, -2 и -3, которые служат основным субстратным материалом для действия ЭПФ. ЭПФ находят в эндотелии сосудов легких, мозга, сердца, плаценты, почек, а также поджелудочной железы и надпочечников млекопитающих. ЭТ-1 по принципу отрицательной обратной связи способен подавлять экспрессию мРНК ЭПФ-1 в эндотелиальных клетках легких, осуществляя таким образом обратную регуляцию [8, 21].

Свойства рецепторов (ЕТА и ЕТВ), с которыми взаимодействуют эндотелины, определяют эффекты этого взаимодействия. Данные рецепторы могут экспрессироваться в клетках как вместе, так и по отдельности. ЕТА преобладают в гладкомышечных клетках сосудов и в миоцитах, а ЕТВ – в эндотелиальных клетках сосудов и почечных канальцев [8, 21]. Связываясь с рецепторами типа А, ЭТ-1 снижает экспрессию эндотелиальной NO-синтазы, тормозит синтез NO и вызывает сокращение гладких мышц сосудов, действуя через фосфолипазу С, что приводит к изменению концентрации Са. Присоединившись к рецепторам типа В-1, локализованным на эндотелиоцитах, ЭТ-1 вызывает расширение сосудов путем торможения образования цАМФ и усиления синтеза NO [8].

Выявлены варианты альтернативного сплайсинга мРНК гена рецептора типа В, имеющие отличия в области цитоплазматического домена и 3'-

нетранслируемого участка. Показана возможность удаления ЭТ-1 из циркуляции через данный «клиренс-рецептор» [21].

Значимую роль в определении эффектов ЭТ играет и его концентрация: в физиологических условиях ЭТ-1 образуется в небольшом количестве, реализуя вазодилататорный эффект через рецепторы типа В-1. В условиях повреждения эндотелия наблюдается усиленная выработка эндотелина, взаимодействующего с рецепторами ЕТА и приводящего к вазоконстрикции [8].

У добровольцев, которым вводили эндотелин в больших дозах, установлены значительные изменения системной гемодинамики: снижение ударного объема сердца и ЧСС, повышение сосудистого сопротивления в большом круге кровообращения на 50% и в малом круге кровообращения на 130%. Установлено, что уровень ЭТ-1 повышается при множестве ССЗ, связанных с повышенным артериальным давлением: ИБС, инфаркт миокарда, легочная гипертензия. Кроме того, имеются данные об изменении концентрации и чувствительности рецепторов к ЭТ-1 у лиц с сердечной недостаточностью [22].

Биосинтез ЭТ-1 регулируется аутокринными механизмами и различными физико-химическими факторами (механические стимулы, изменения парциального давления кислорода или рН, действие вазопрессина, ангиотензина II, факторов роста, цитокинов, липопротеинов, молекул клеточной адгезии). Установлено, что в условиях гипертензии или повреждения эндотелия балонным катетером уровень ЭТ-1 возрастает. Увеличение внутриклеточного  $Ca^{2+}$  также стимулирует выработку ЭТ-1 [22].

Помимо стимулирующего действия ЭТ-1 на высвобождение NO через рецептор типа В, известно, что NO ингибирует продукцию ЭТ-1, вероятно через ингибирование супероксида. Простациклины и натрийуретический пептид также способны угнетать секрецию ЭТ-1 [28].

Другим вазоконстриктором, выделяемым эндотелием, является АТ II – завершающий продукт активации РАС, вазоактивный пептидный фактор, вызывающий вазоконстрикцию и, как следствие, повышение АД.

Стимулирующее воздействие АТ II на корковый слой надпочечников приводит к высвобождению альдостерона, эффекты которого связаны с активацией реабсорбции натрия и воды в почках. Вследствие этого наблюдается повышение объема циркулирующей крови, исходя из чего можно говорить о развитии перманентной АГ при возрастании активности РАС. Гиперактивация РАС негативна не только с позиции ее гипертензивного эффекта. Доказана патологическая роль РАС в развитии почечной недостаточности и осложнений сахарного диабета [48].

В почках последствия сильного вазоконстрикторного эффекта АТ II проявляются более выраженным сокращением эфферентных артериол, по сравнению с афферентными, вследствие чего наблюдается рост гломерулярного давления и усиление фильтрации жидкости из крови. Однако из-за снижения гидростатического давления и повышения онкотического давления крови в эфферентном отделе почечных клубочков, описанный выше эффект уравнивается возрастанием реабсорбции жидкости. Несмотря на уменьшение объема почечной перфузии, скорость гломерулярной фильтрации на фоне снижения экскреции натрия поддерживается на стабильном уровне, также увеличивая реабсорбцию жидкости в периферических отделах нефрона.

Кроме того, АТ II стимулирует образование в гипоталамусе и высвобождение из задней доли гипофиза антидиуретического гормона, который усиливает реабсорбцию натрия, вызывает чувство жажды и обладает вазоконстрикторным эффектом [48].

Действию АТ II отводят определяющую роль в развитии сердечно-сосудистой патологии – АГ, ИБС, атеросклероза и сердечной недостаточности. Установлено 4 типа рецепторов, опосредующих эффекты АТ II. Рецепторы 1-го (AGT2R1) и 2-го (AGT2R2) типа располагаются в эндотелии. Через AGT2R1 модифицируются основные физиологические и патологические сердечно-сосудистые эффекты АТ II. Роль рецепторов AGT2R2 четко не установлена. В физиологических условиях они слабо представлены в сердечно-сосудистой системе. Рост их экспрессии связывают с воспалением и

ремоделированием сердца и сосудов, артериальной гипертензией, атеросклерозом, инфарктом миокарда, сахарным диабетом 2-го типа [48].

Таким образом, при помощи вазоконстрикторов и вазодилататоров, выделяемых эндотелием, реализуются две противоположные сосудистые реакции (сокращение и расслабление), вызываемые различными механизмами.

## **1.2. Эндотелиальная дисфункция**

Эндотелиальная дисфункция связана с нарушением равновесия в системе выработки вазоконстрикторов и вазодилататоров, про- и антикоагулянтов, факторов роста и их ингибиторов. Дисфункция эндотелия имеет сложный патогенез и в ее развитии принимают участие множество факторов: возраст, курение, оксидативный стресс, повреждение эндотелия, действие липопротеинов низкой плотности, тромбомодулина, растворимого E-селектина.

Несмотря на то, что механизмы эндотелиальной дисфункции окончательно не выяснены, на данный момент ведущая роль в ее патогенезе отводится именно снижению активности NOS3, что приводит к уменьшению продукции NO, которая в физиологических условиях преобладает над секрецией ЭТ-1 и поддерживает базальный тонус сосудов.

Экспериментальные и клинические исследования показали, что в патогенезе артериальной гипертензии и атеросклеротических изменений важную роль играет нарушение функции эндотелия в крупных и резистивных сосудах. Снижение уровня NO и постепенное усугубление вазоконстрикции приводит к постоянно повышенному АД. На начальных стадиях развития артериальной гипертензии повышение уровня NO носит компенсаторный характер вследствие реализации вазодилаторного эффекта оксида азота в ответ на повышенное артериальное давление. Также, в ответ на повышенное АД макрофагами вырабатываются цитокины, которые способны стимулировать выработку NO через NOS2. Такое повышение может приводить к постепенному снижению биодоступности NO. Со временем, по принципу отрицательной

обратной связи повышенный уровень NO начинает тормозить работу NOS3. [32]. Данные процессы приводят к снижению плазменного уровня оксида азота на фоне повышающегося артериального давления.

Кроме того, эндотелиновые рецепторы типа A и рецепторы типа B на гладкомышечных клетках при эндотелиальной дисфункции могут опосредовать образование супероксида ( $O_2^-$ ). Супероксид снижает биологическую активность NO, образуя пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) (рис.1).

Активные формы кислорода, помимо интерференции с NO способны ингибировать и другие эндотелий-зависимые сосудорасширяющие пути, опосредованные через простагландин и эндотелиальный гиперполяризующий фактор [28].

Отметим, что влияние ЭТ-1 на коронарную вазоконстрикцию более выражено в состоянии пониженной биодоступности eNOS-кофактора тетрагидробиоптерина ( $BH_4$ ). В состоянии дефицита  $BH_4$  NO-синтаза начинает генерировать супероксид вместо NO [28].

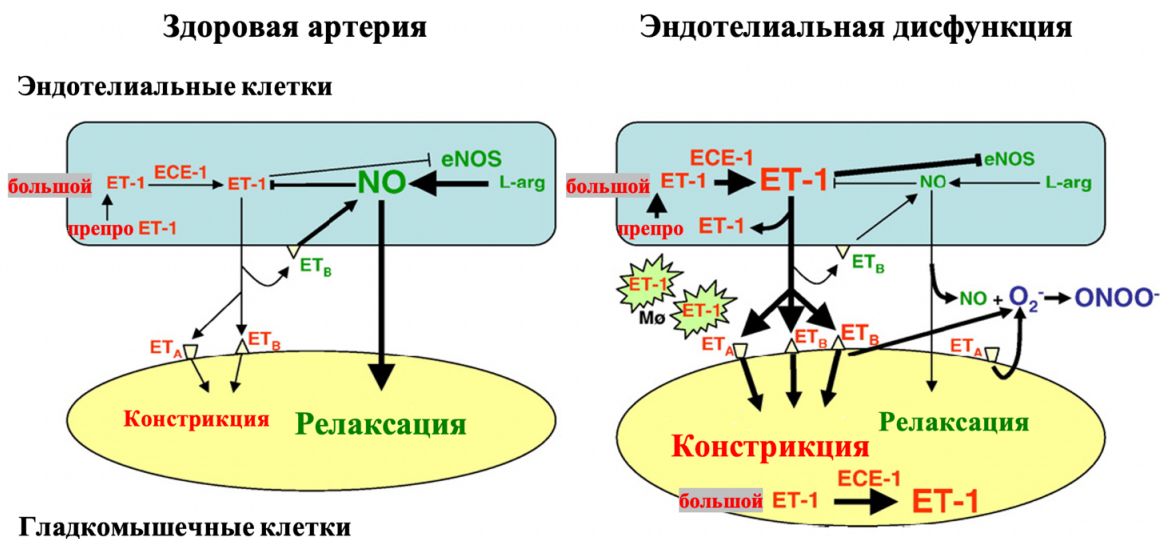


Рисунок 1 – Артериальная стенка здоровой артерии и состояние эндотелиальной дисфункции [28]

Совокупный баланс эффектов при эндотелиальной дисфункции смещается в сторону большей вазоконстрикции, воспаления и окислительного стресса [28].



### 1.3. Роль полиморфизма -786T>C гена NOS3 в развитии вазоконстрикции

В возникновении кардиоваскулярной патологии, занимающей лидирующую позицию в структуре причин смертности трудоспособного населения по всему миру, определяющее значение наряду с воздействием факторов окружающей среды отводится детерминирующим генетическим факторам риска, выявление которых стало возможным благодаря развитию методов определения генотипа.

В настоящее время ведется активное изучение генетической природы торможения экспрессии и активности NOS3. Ген, кодирующий синтез фермента NOS3, расположен в локусе 7q36, состоит из 26 экзонов и включает 21 тыс. пар нуклеотидов. В экзонах и интронах данного гена расположено несколько полиморфных участков, от которых зависит активность NOS3 и, соответственно, уровень NO в крови. Некоторые полиморфизмы гена NOS3 можно рассматривать как факторы риска формирования сердечно-сосудистой патологии [34].

Одним из наиболее изучаемых полиморфных вариантов гена NOS3 является полиморфизм -786T>C (rs2070744). Он представляет собой SNP-мутацию в промоторе гена NOS3, в частности замену тимина на цитозин, приводящую к значительному снижению (до 50-52%) активности фермента NOS3 и снижению уровня NO в крови [34]. «Диким» вариантом полиморфизма является генотип T/T.

Casas et al. по результатам мета-анализа установили снижение экспрессии гена NOS3 и последующий низкий уровень мРНК и нитратов / нитритов в сыворотке крови у лиц-носителей аллеля -786C [31]. В то же время некоторые исследователи в своих работах не выявили ассоциации полиморфизма -786T>C гена eNOS с изменением уровня оксида азота и с развитием сердечно-сосудистых заболеваний [44, 57], что, возможно, объясняется малым объемом выборки в данных исследованиях.

Наблюдаются этнические особенности распространенности и проявления в геноме полиморфизма -786T>C гена NOS3. Так, в популяциях Европы частота встречаемости аллеля -786C колеблется от 0,296 до 0,420, в то время как в южно-американских популяциях аллель C встречается значительно реже - в интервале от 0,017 до 0,280, в азиатских популяциях - в интервале от 0,058 до 0,212, а в африканских – от 0,047 до 0,175. Частота встречаемости гетерозигот по полиморфизму -786T>C среди европейцев колеблется от 0,420 до 0,490, в популяциях Южной Америки – от 0,030 до 0,400, у азиатов – от 0,110 до 0,330, среди африканцев – от 0,090 до 0,290 (The Allele FREquency Database; <http://alfred.med.yale.edu>). Данную частоту встречаемости полиморфизма подтверждают и несколько последних масштабных мета-обзоров, в которых отмечено, что наиболее значимая роль полиморфного аллеля C в формировании артериальной гипертензии и ИБС выявлена среди представителей азиатской популяции. Установлено, что для азиатов характерна более низкая распространенность генотипа -786C/C (0,076) по сравнению с европейцами (0,323) и относительно низкая частота встречаемости ИБС [31, 49, 62].

Отмечено, что полиморфный аллель C служит предиктором в отношении ИБС и артериальной гипертензии в сумме с такими факторами, как курение и потребление соли [52, 55].

Отмечена ассоциация генотипа -786C/C гена NOS3 с риском развития резистентной гипертензии, инфаркта миокарда, повышенным риском рестенозов после стентирования венечных артерий [40].

При обследовании коренных малочисленных народов Крайнего Севера (эвенки, эвены, народы Саха) и некоренных народов - жителей республики Саха (русские, украинцы, белорусы, киргизы, узбеки, китайцы, поляки), страдающих эссенциальной артериальной гипертензией, авторами было установлено, что гомозиготный генотип -786C/C чаще встречается у некоренных народов Севера [11].

Лица с генотипами -786C/C и -786T/C характеризуются хорошим ответом на антигипертензивную терапию ингибитором ангиотензинпревращающего

фермента эналаприлом по сравнению с недостаточно активным ответом на соответствующую терапию в группе лиц с генотипом -786Т/Т [58].

В немногочисленных работах описываемый полиморфизм исследовался в группе молодых практически здоровых людей. Выявлено, что аллель -786Т чаще встречался в группе спортсменов и был ассоциирован с более высокими показателями скорости и силы в сравнении с показателями лиц, не имеющих регулярной физической нагрузки [35]. Однако большая часть исследований оценивает полиморфизм -786Т>С у лиц в средней и пожилой возрастной группе с уже диагностированной сердечно-сосудистой патологией [45, 49].

Изучение взаимосвязи полиморфизма -786Т>С, особенностей гемодинамики и уровня производных оксида азота в крови пожилых людей при действии аэробной нагрузки показало, что у гомозигот Т/Т наблюдается статистически значимо более высокий уровень производных NO в плазме крови в сравнении с лицами-носителями аллеля -786С [36]. Данный факт доказан и в других исследованиях, где мужчины - носители полиморфного аллеля -786С продемонстрировали более благоприятный антигипертензивный эффект от аэробной нагрузки, чем мужчины с генотипом Т/Т [27].

По данным обследования больных, оперированных по поводу стеноза внутренней сонной артерии, выявлено, что генотип -786С/С ассоциирован с диагностированной патологией (26% пациентов против 13% практически здоровых лиц из контрольной группы). Среди группы больных со стенозом сонной артерии генотип -786С/С в 2,6 раза повышал вероятность изъвления атеросклеротической бляшки [40].

У юношей европеоидной расы установлена взаимосвязь полиморфизма -786Т>С с гипертонической реакцией на дозированную физическую нагрузку. Авторы связывают формирование гипертонической реакции с более высоким уровнем эндотелина-1 у носителей генотипа -786С/С гена NOS3 и развитием эндотелиальной дисфункции. Известно, что данный тип реакции на физическое напряжение характерен для лиц с артериальной гипертензией, пред-

гипертоников и лиц, имеющих нарушение регуляции механизмов поддержания сосудистого тонуса [3, 4].

В исследованиях, в которые были включены девушки, установлено влияние эстрогенов на экспрессию гена NOS3. Так, прямое фосфорилирование рецепторов для эстрогенов запускает передачу сигнала через протеинкиназный каскад, что в дальнейшем активирует эндотелиальную NO-синтазу [20]. Выявлено, что у девушек полиморфизм -786T>C оказывает менее выраженное действие на гемодинамику, чем у юношей [2].

#### **1.4. Полиморфизм -786T>C гена NOS3 в профессиональном спорте**

Особый научный интерес в спортивной генетике представляют исследования, направленные на поиск специфических генетических детерминант спортивной успешности. В рамках отечественных и зарубежных исследований выявлено более 200 «спортивных полиморфизмов», имеющих повышенную концентрацию в спортивной среде и связанных с развитием определенных физических качеств [13].

В настоящее время актуален вопрос о том, какой генетический профиль вносит вклад в статус элитного спортсмена. Из данных литературы следует, что 2/3 разнообразия статуса спортсмена зависит от генетических факторов; 1/3 связана с влиянием факторов внешней среды, таких как образ жизни, экология, питание [10, 23]. В связи с этим большая роль в спортивном отборе отводится стабильным наследственно обусловленным показателям, определяемым молекулярно-генетическими методами в ходе обследования спортсменов.

Стоит отметить, что большинство научно-исследовательских методик и рекомендаций апробируются на взрослых спортсменах, что не совсем целесообразно, учитывая раннее начало профессиональной спортивной карьеры.

Генетика определяет важные компоненты спортивного успеха, к которым относится мощьность, сила, выносливость, нервно-мышечная координация,

гибкость, скорость реакции, мышечный размер и состав волокна, темперамент [10, 16]. Наиболее генетически наследуемы морфологические показатели в сравнении с физиологическими и психологическими [18]. Существуют генетические маркеры, ограничивающие двигательную активность человека, в частности маркеры адаптации сердечно-сосудистой системы к интенсивной физической деятельности. «Наиболее благоприятным» итогом такого ограничения является прекращение роста спортивных результатов, наихудшим - развитие патологии [17]. Молекулярно-генетическое тестирование в спорте позволит выявить риски профессиональных заболеваний, ухудшающих качество жизни человека и ограничивающих его физическую работоспособность.

Полиморфизм -786T>C гена NOS3 (rs2070744) является одним из изучаемых «спортивных полиморфизмов». Интерес исследователей в области спорта к данному полиморфизму обусловлен его ролью в вазодилатации кровеносных сосудов и определении аэробных возможностей человека.

Повышенная активность системы оксида азота в эпителиоцитах и гладкомышечных клетках, наблюдающаяся вследствие кратковременного физического напряжения, сопровождается функциональной адаптацией сосудов, однако сохраняется недолго и исчезает через несколько недель после прекращения действия нагрузки. У спортсменов, имеющих длительные регулярные тренировки, краткосрочная адаптация сосудов заменяется NO-зависимым ангиогенезом, в ходе которого улучшается поступление питательных веществ и кислорода в скелетные мышцы и миокард, что является механизмом адаптации организма к систематической мышечной нагрузке [51].

Адаптационные реакции кардиореспираторной системы к физическим нагрузкам изучались среди украинских спортсменов. Установлено, что взаимодействие полиморфизмов Pro12Ala гена PPARG и -786T>C гена NOS3 в генотипе статистически значимо влияет на показатель легочной вентиляции. Наличие в генотипе аллеля -786C повышает величину вентиляционного эквивалента по кислороду. Спортсменки - носители аллеля -786C

демонстрировали снижение аэробной производительности, проявляющейся в уменьшении мощности выполненной работы на 7%, а спортсмены-носители аллеля -786С проявили незначительное увеличение аэробной мощности. При физических нагрузках ступенчато-растущей мощности носительство генотипа -786С/С опосредовало ухудшение экономичности легочной вентиляции [24].

Установлено, что среди украинских спортсменов аллель -786С гена NOS3 не лимитирует физическую работоспособность в академической гребле. Отметим, что соотношение аэробной и анаэробной работы гребцов составляет 70 на 30% соответственно. Авторы не выявили статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей между группой спортсменов и контрольной группой. Отмечено, что в группе спортсменов наблюдается небольшое преобладание частоты аллеля -786Т. В ходе сравнительного анализа распределения частоты аллелей и генотипов среди представителей высококвалифицированных спортсменов (заслуженные мастера спорта и мастера спорта международного класса) и квалифицированных гребцов (мастера спорта, кандидаты в мастера спорта, I-II разряд) установлены незначительные различия в частоте встречаемости аллеля -786С среди спортсменов разного уровня квалификации (0,293 у спортсменов высокого уровня квалификации и 0,364 у квалифицированных гребцов) [25].

Для украинских спортсменов установлено, что одним из наиболее благоприятных генотипов для развития высокой работоспособности в лыжных гонках является генотип Т/Т полиморфизма -786Т>С гена NOS3. -786Т аллель описывается как один из маркеров предрасположенности к развитию физических качеств, дающих преимущество в этом виде спорта за счет его благоприятного влияния на аэробную выносливость и адаптацию к гипоксии. Отметим, что соотношение аэробной и анаэробной работы в данном виде спорта 95 на 5% соответственно. Авторами не было установлено статистически значимых различий в частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма -786Т>С между группой спортсменов и контрольной группой. Стратифицированный анализ показал, что у мастеров спорта международного

класса генотип Т/Т встречался на 33,3% чаще, чем у спортсменов более низкой квалификации. Частота аллеля -786С в группе высококвалифицированных лыжников на 16,6% меньше, чем в группе квалифицированных лыжников [26].

Выявлено, что распределение генотипов по полиморфизму -786Т>С в группе украинских легкоатлетов значительно отличается от распределения в контрольной группе лиц, не имеющих систематической физической нагрузки. В группе спортсменов частота генотипа Т/Т выше на 15,6%, а генотипов Т/С и С/С ниже на 8,3% и 7,3% соответственно. Авторами показаны статистически значимые различия в распределении частот аллелей по данному полиморфизму между группой спортсменов (Т - 0,777, С - 0,223) и контрольной группой (Т - 0,662, С - 0,338). Учитывая, что данный полиморфизм приводит к уменьшению продукции NO в крови человека, влияя на обеспечение долгосрочной адаптации к физическим нагрузкам значительного объема и интенсивности, очевидна неблагоприятная роль наличия в генотипе аллеля -786С для данных видов спорта. Отмечена генетическая неоднородность среди спортсменов, специализирующихся в различных видах легкой атлетики. Частота аллеля -786Т статистически значимо отличалась между группой спортсменов, специализирующихся в прыжках (0,804) и контрольной группой (0,662). Для спортсменов, специализирующихся в метаниях (Т - 0,750), и спринтеров (Т - 0,750) статистически значимой разницы авторы не обнаружили [9].

Положительное влияние наличия аллеля -786Т в генотипе на развитие элитных показателей в силовых соревнованиях доказано и при обследовании спортсменов испанского происхождения. Авторы установили, что генотип Т/Т статистически значимо чаще встречался у силовых спортсменов (0,570), чем в группе спортсменов, тренирующих выносливость (0,330) или контрольной группе (0,340). Частота аллеля -786Т также была выше у силовых спортсменов (0,710), чем у тренирующих выносливость (0,550) и группы контроля (0,560). Между контрольной группой и группой выносливости статистически значимых различий авторы не выявили [41]. Ассоциация полиморфизма -786Т>С гена

NOS3 со статусом элитного силового спортсмена подтверждается несколькими последними масштабными метаанализами [61].

По результатам исследования силовых и скоростных показателей, а также спортивного статуса среди уругвайских и английских футболистов юношеской лиги на разных стадиях профессиональной квалификации в сравнении с контрольной группой, показано, что -786T/T гомозиготы имеют лучшие результаты в 10-метровом спринте, чем -786C/C гомозиготы. Авторы связывают данный факт с возможностью стимуляции гипертрофии мышц через NO-зависимую вазодилатацию. Выявлены статистически значимые различия в частоте встречаемости аллелей полиморфизма -786T>C среди спортсменов (T - 0,647, C - 0,353) и лиц контрольной группы (T - 0,573, C - 0,427) [54].

В то же время, среди испанских футболистов установлено, что с элитным статусом ассоциирован аллель -786C гена NOS3. Вероятность наличия аллеля -786C в генотипе футболистов была в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой; в 1,9 раз выше по сравнению со спортсменами, тренирующими выносливость и в 4 раза выше по сравнению с силовыми спортсменами [38].

Среди польских пловцов установлено, что частота встречаемости аллеля -786T статистически значимо выше в группе пловцов на длинные дистанции (>500м), имеющих преимущественно аэробную нагрузку по сравнению с группой контроля (77% против 63,1%). Среди группы спортсменов вероятность быть пловцом на длинные дистанции в 8,5 раз выше для носителей аллеля -786T, который является благоприятным в данном виде спорта [66].

С учетом клинического значения полиморфизма -786T>C гена NOS3, отметим исследования по поиску взаимосвязи данного полиморфного варианта с развитием сердечно-сосудистой патологии у спортсменов. Среди российских спортсменов юношеской лиги в различных видах спорта установлена отрицательная корреляция электрокардиографического интервала QTc с полиморфизмом -786T>C гена NOS3, что свидетельствует о влиянии гомозигот C/C на величину данного интервала, отражая вероятность негативных последствий интенсивной физической активности [23].



## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. База исследования**

Исследование выполнено на базе кафедры медицинской биологии и генетики, а также Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Архангельск) в период с марта 2019 года по апрель 2021 года.

Все участники исследования подписывали добровольное информированное согласие, утвержденное локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» (г. Архангельск) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **2.2. Материал и объем исследования**

Исследуемая выборка включала 297 человек, из них группа профессиональных спортсменов составила 106 человек (средний возраст – 18,1 лет; 95% ДИ: 18,0–18,3). Контрольная группа (практически здоровые лица, не занимающиеся профессионально спортом) составила 191 человек (средний возраст – 18,6 лет; 95% ДИ: 18,5-18,7).

Критерии включения в исследование: возраст от 18 до 22 лет, проживание на территории Европейского Севера с рождения; для контрольной группы - обучающихся ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» – отсутствие профессиональных занятий спортом, для профессиональных спортсменов, занимающихся в ГАУ АО «Спортивная школа олимпийского резерва «Поморье»» - наличие спортивных разрядов / званий.

Критерии исключения из исследования: наличие острых воспалительных заболеваний, любых хронических заболеваний внутренних органов (в том

числе заболеваний сердечно-сосудистой системы), ожирение, курение, прием лекарственных препаратов и биологически активных добавок.

Материалом для проведения лабораторного исследования являлись образцы венозной крови, полученные утром натощак (не менее 10-12 часов после последнего приема пищи) путем венепункции локтевой вены в стерильных условиях в пробирки, содержащие калиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта (Greiner Bio One, Австрия). Плазму отделяли центрифугированием образцов крови в течение 15 минут при 1000g; готовили аликвоты и хранили в пластиковых пробирках «Эппендорф» при температуре  $<-20^{\circ}\text{C}$  до момента проведения лабораторного исследования.

### **2.3. Методы исследования**

#### **Типирование полиморфизма -786T>C гена NOS3 методом ПЦР с флуоресцентной схемой детекции продуктов в режиме реального времени**

Принцип метода. Анализируется геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови, с которой параллельно проводят 2 реакции амплификации (с 2-мя парами аллель-специфичных праймеров). Для детекции амплифицированного фрагмента ДНК используют интеркалирующий краситель SYBR Green (набор «SNP-экспресс-кардиогенетика», Литех), специфичный к двухцепочечной молекуле ДНК. Получают один из 3-х результатов: гомозигота по аллели 1, гетерозигота, гомозигота по аллели 2.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови. 1000 мкл цельной крови, предварительно перемешанной до однородности, вносят в пробирку типа «Эппендорф» с замком. Пробирку закрывают и центрифугируют со скоростью 3000 об/мин при комнатной температуре 5 минут. В результате центрифугирования кровь делится на плазму и форменные элементы. Тонкий слой лейкоцитов располагается на поверхности осадка форменных элементов.

Далее пипеткой аккуратно удаляют плазму, не захватывая при этом лейкоциты. Полное удаление плазмы без захвата лейкоцитов практически невозможно, поэтому в пробирке следует оставить тонкий слой плазмы. Пробирку закрывают, выдерживают при  $-20^{\circ}\text{C}$  до полного замораживания форменных элементов (1 час). При комнатной температуре полностью размораживают содержимое пробирки. В пробирку вносят реактив для выделения ДНК. Его объем должен быть равен объему оставшейся в пробирке плазмы и форменных элементов. Пробирку закрывают и в течение 10 секунд содержимое тщательно перемешивают на вортексе. На микроцентрифуге осаждают капли. Пробирку устанавливают в предварительно прогретый до  $99^{\circ}\text{C}$  термостат и выдерживают при данной температуре 15 минут. Затем пробирку помещают в высокоскоростную микроцентрифугу замком в сторону оси. 1 минуту центрифугируют со скоростью 8000-14000 об/мин при комнатной температуре. Полученный супернатант используют в качестве исследуемого образца ДНК.

Постановка реакции амплификации. Бесцветные пробирки с оптическими крышками вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного и отрицательного контроля, ставят в порядке, указанном в протоколе измерений. Маркировка пробирок не допускается. Готовят по 2 пробирки для каждой пробы: аллель 1 и аллель 2. Комплект реагентов для ПЦР размораживают за 30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси. Пробирки с полностью размороженным раствором разбавителя и реакционной смесью тщательно встряхивают для перемешивания содержимого. Непрозрачную пробирку с красителем центрифугируют на микровортексе, чтобы сбросить капли с крышки на дно, потом встряхивают для перемешивания и снова центрифугируют. Затем готовят рабочие смеси реагентов для амплификации. В расчете на 1 пробу берут 17,5 мкл разбавителя, 2,5 мкл реакционной смеси, 0,2 мкл красителя, 0,2 мкл Taq-полимеразы (вносят в последнюю очередь и перед ее внесением смесь немного перемешивают). Готовят 2 рабочие смеси (с реакционной смесью аллель 1 и реакционной смесью аллель 2). Все компоненты при приготовлении рабочей

амплификационной смеси добавляют отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами – фильтрами. Смесь тщательно перемешивают либо пипетированием (при объеме менее 200 мкл), либо импульсным вортексированием 15-20 раз. В приготовленные пробирки вносят по 20 мкл полученной рабочей смеси. Затем вносят по 5 мкл выделенной ДНК (наконечники с фильтром) в пробирки с рабочей амплификационной смесью аллель 1 и аллель 2. В качестве отрицательного контроля вносят разбавитель по 5 мкл в оба типа реакционной смеси. В качестве положительного контроля – положительный контрольный образец ДНК по 5 мкл в оба типа реакционной смеси. В каждую пробирку вносят по 1 капле минерального масла. Пробирки закрывают, центрифугируют 3-5 секунд при 1500-3000 об/мин на вортексе при комнатной температуре; затем устанавливают в прибор (LightCycler 96) в соответствии с подготовленным протоколом. После установки соответствующих параметров реагентов и температуры запускают эксперимент.

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации (всего 35 циклов). На основании полученных данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу. Результаты учитываются согласно инструкции к набору.

### **Определение уровня NO в плазме крови**

Определение уровня NO в плазме крови осуществлялось с помощью набора группы «ВСМ Биохиммак» - «Total NO/Nitrite/Nitrate Assay» - Набор для количественного определения окиси азота в культуральной среде, сыворотке, плазме и моче. Уровень вазодилатора NO определяли по суммарной концентрации его стабильных метаболитов (нитратов и нитритов) в депротеинизированной плазме. Принцип метода основан на ферментном превращении нитрата в нитрит с участием фермента нитрат-редуктазы. Метод колориметрически регистрирует концентрацию нитрита по азокрасителю,

образующемуся в реакции Грисса, в основе которой лежит двухстадийная реакция диазотирования, где кислый  $\text{NO}_2$  производит нитрозатирующий агент, реагирующий с сульфаниловой кислотой с образованием иона диазония. Данный ион присоединяется к N-(1-нафтил) этилендиамину с формированием цветного азопроизводного, поглощающего свет на длине волны 540-570 нм.

Перед анализом образцы плазмы пропускают через фильтр 10000 MW и разводят в 2 раза реакционным разбавителем, предварительно разведенным в 10 раз. При разбавлении реагентов используется дистиллированная вода с целью избежать нитрит / нитратной контаминации.

Протокол анализа с нитрат-редуктазой. В ячейки для бланка добавляют по 50 мкл реакционного разбавителя, предварительно разведенного в 10 раз. В оставшиеся ячейки добавляют по 50 мкл стандарта нитрата или образца. Во все ячейки добавляют по 25 мкл NADH. Затем во все ячейки добавляют по 25 мкл разбавленной нитрат-редуктазы. Перемешивают, осторожно постучав по боковой стороне рамки, и заклеивают стрипы пленкой. Инкубируют 30 минут при  $37^{\circ}\text{C}$ . Во все ячейки добавляют по 50 мкл реактива Грисса I и реактива Грисса II. Перемешивают, осторожно постучав по боковой стороне рамки. Инкубируют при комнатной температуре 10 минут. Далее определяют оптическую плотность в ячейках при длине волны 540 нм (референс-фильтр 690 нм). Затем рассчитывают среднее значение оптической плотности из дублей для каждого стандарта и образца, вычитая значение оптической плотности бланка. Используя программное обеспечение, строится стандартная 4-параметрическая кривая. Суммарная концентрация нитрита анализируемых образцов рассчитывается из полученной стандартной кривой соответственно средней оптической плотности. Чувствительность метода 0,25 мкмоль/л. Референтный диапазон NO для данной методики составляет 10-92 мкмоль/л.

### **Определение уровня ЭТ-1 в плазме крови**

Анализ содержания эндотелина-1 в плазме крови осуществлялся методом ИФА с использованием диагностического набора «Quantikine ELISA Endothelin-

1 Immunoassay» - «Иммуноферментный набор для количественного определения эндотелина-1 в супернатантах клеточных культур, сыворотке, плазме и моче» группы «ВСМ Биохиммак». Метод позволяет точно определять содержание синтетического и нативного эндотелина-1 человека.

Тест основан на количественном твердофазном иммуноферментном анализе типа «сэндвич». Лунки микропланшета покрыты специфическими моноклональными антителами к эндотелину-1. В ходе реакции в лунки микропланшета вносят стандарты и образцы. Эндотелин-1, находящийся в образце, связывается с иммобилизованными антителами. После промывки несвязавшиеся компоненты удаляются. Затем в лунки вносят моноклональные антитела к эндотелину-1, конъюгированные с ферментом. После второй промывки и удаления несвязавшегося конъюгата «фермент-антитела» добавляется раствор субстрата, взаимодействующий с ферментом с образованием цветного комплекса. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации эндотелина-1, присутствующего в образце. Цветная реакция останавливается стоп-реагентом и интенсивность окраски измеряется на микропланшетном фотометре.

Процедура анализа. Реагенты и образцы перед использованием должны достичь комнатной температуры (18-25<sup>0</sup>С). Во все лунки вносят по 150 мкл рабочего буфера. В соответствующие лунки вносят по 75 мкл каждого стандарта, контроля или образца. Стрипы заклеивают адгезивной пленкой; инкубируют 1 час при комнатной температуре на горизонтальном орбитальном микропланшетном шейкере. Далее содержимое лунок полностью удаляется. Лунки промывают 3 раза с использованием 400 мкл буфера для промывок на каждую лунку на один промывочный цикл. При этом используется сжимаемая бутылка, многократный диспенсер или автоматическое промывающее устройство. С целью получения высокоточных результатов принципиально полное удаление жидкости при каждом цикле промывки. После последнего цикла наряду с удалением остатков буфера для промывок следует постучать перевернутым микропланшетом по чистой фильтровальной бумаге. Далее в

каждую лунку вносят по 200 мкл эндотелин-1 конъюгата. Стрипы заклеивают новой адгезивной пленкой и инкубируют на шейкере при комнатной температуре 3 часа. Затем полностью повторяют промывку, как указано выше. Далее во все лунки вносят по 200 мкл субстратного раствора и инкубируют 30 минут в защищенном от воздействия света месте. Затем во все лунки вносят по 50 мкл стоп-раствора, при этом цвет раствора в лунках должен измениться с голубого на желтый. Не позднее чем через 30 минут в лунках измеряется оптическая плотность при длине волны 450 нм. Для устранения оптических дефектов планшета используют длину волны сравнения 540 или 570 нм.

Далее идет расчет среднего значения оптической плотности для каждого стандарта, контроля и образца и вычитание среднего значения оптической плотности нулевого стандарта. Используя соответствующее компьютерное обеспечение (4-х параметрическая логистическая аппроксимация) строится калибровочная кривая и определяется искомая концентрация эндотелина-1 в анализируемых образцах.

Чувствительность метода 0,035 фмоль/мл. Референтный уровень эндотелина 1 для данной методики составляет до 1,03 фмоль/мл.

Для выявления дисбаланса вазоактивных эндотелиальных факторов рассчитывали индекс соотношения вазодилататор/вазоконстриктор (NO/ЭТ1).

### **Определение уровня ангиотензина II в плазме крови**

Для анализа содержания ангиотензина II использовали иммуноферментный набор «AssayMax Human Angiotensin II ELISA Kit» группы «ВСМ Биохиммак», предназначенный для количественного определения человеческого ангиотензина II в образцах плазмы, сыворотки крови и супернатантах клеточных культур.

Метод основан на «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа. Специфичные к ангиотензину II поликлональные антитела сорбированы в лунках 96-луночного микропланшета. Ангиотензин II, присутствующий в

стандартах и образцах, связывается с иммобилизованными антителами и биотинилированными поликлональными антителами, специфичными к ангиотензину II, образуя при этом «сэндвич». Биотинилированные поликлональные антитела к ангиотензину II связываются с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. При промывке удаляются все несвязавшиеся компоненты. В лунки вносится ферментный субстрат. Развитие окрашивания останавливают стоп-реагентом. Затем измеряют интенсивность окрашивания.

Протокол анализа. Все реагенты перед началом анализа должны достичь комнатной температуры. В соответствующие лунки вносят по 50 мкл стандартов или образцов. Лунки закрывают адгезивной пленкой и инкубируют 2 часа. Затем лунки промывают 5 раз, используя по 200 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. На каждом шаге микропланшет переворачивается, жидкость сливается из лунок. Для полного удаления остатков жидкости следует постучать микропланшетом 4-5 раз по фильтровальной бумаге. Далее во все лунки вносят по 50 мкл биотинилированных антител к ангиотензину II и инкубируют 2 часа. Затем промывают лунки микропланшета, как было описано выше. Во все лунки вносят по 50 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена и инкубируют 30 минут. Лунки микропланшета промывают 5 раз по 200 мкл буфера для промывок. Во все лунки вносят по 50 мкл хромогенного субстрата и инкубируют 20 минут или до развития оптимальной окраски. Для тщательного перемешивания аккуратно постукивают по краю микропланшета. Пузырьки воздуха удаляют с помощью наконечника для пипетки. Во все лунки вносят по 50 мкл стоп-реагента, при этом окрашивание меняется с голубого на желтое. Считывание оптической плотности с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм производят немедленно. Для коррекции оптических неточностей вычитают значения оптической плотности, измеренные при 570 нм (длина волны сравнения) из значений оптической плотности, измеренных при 450 нм. Учитывают, что в течение 10 минут после внесения стоп-раствора в



реакционной смеси могут образовываться нестабильные черные частицы, что может привести к занижению значений оптической плотности.

Рассчитывают среднее значение оптической плотности для каждого дубля стандартов и образцов. По калибровочной кривой определяют концентрацию ангиотензина II в анализируемых образцах; полученное значение умножают на соответствующий коэффициент разведения.

### **Проба с дозированной физической нагрузкой**

Гемодинамические исследования проводились утром натощак, при температуре воздуха 22-24<sup>0</sup>С. Перед проведением измерений обследуемые отдыхали в течение 15-20 минут.

Для оценки функционального состояния ССС применялась проба Мартине-Кушелевского – 20 приседаний за 30 секунд. Данная проба является стандартной нагрузочной пробой, которая отражает способность сердечно-сосудистой системы к восстановлению после занятий физическими упражнениями и отличается простотой и информативностью [7].

Артериальное давление и ЧСС фиксировали на автоматическом цифровом приборе МТ-40 производства «Meditech» (США).

Измерение начиналось с подсчета пульса у обследуемого, сидящего в спокойном положении, по 3-м десятисекундным отрезкам, из которых выбирали среднее значение. Затем измеряли артериальное давление. Далее обследуемый выполнял 20 глубоких приседаний с подниманием рук вперед в течение 30 секунд, при этом манжетка с руки не снималась. После нагрузки у обследуемого сразу определяли АД и ЧСС. Следующее измерение гемодинамических показателей проводили через 3 минуты после нагрузки. В оценке результатов пробы учитывали степень увеличения частоты сердечных сокращений, артериального давления и время их реституции. Тип реакции сердечно-сосудистой системы на дозированную физическую нагрузку определяли исходя из показателей, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 - Параметры центральной гемодинамики для определения типа реакции ССС на дозированную физическую нагрузку

Тип реакции ССС на нагрузку	ЧСС	АД	Время восстановления ЧСС и АД
Нормотонический	Учащение не более 50-70 % от исходной величины	САД повышается не более 20-30 мм рт.ст., ДАД остается постоянным или снижается на 5-10 мм рт.ст.	До 3-х минут
Гипертонический	Значительное учащение	Резкое повышение САД с повышением ДАД	Более 3-х минут

По данным литературы гипертоническая реакция на физическую нагрузку наблюдается у лиц с выраженными вазомоторными изменениями, патологией ЦНС, в начальных стадиях гипертонической болезни, у перетренированных спортсменов, лиц с психическим и физическим перенапряжением. Таким образом, гипертонический тип реакции ССС на нагрузку является одним из факторов риска развития артериальной гипертензии [7].

### Определение типа саморегуляции кровообращения

Тип саморегуляции кровообращения является информативным интегральным показателем, который отражает особенности адаптивно-приспособительных реакций организма человека. ТСК определяется по формуле:  $TCK = (ДАД/ЧСС) \times 100$ . На основании анализа соотношения сердечного и сосудистого компонентов центральной гемодинамики выделяют 3

типа саморегуляции кровообращения: сердечный (ТСК<90 усл. ед.), сосудистый (ТСК>110 усл. ед.) и сердечно-сосудистый (ТСК от 90 до 110 усл. ед.). Определение ТСК позволяет оценить уровень напряжения в регуляции ССС. Оптимально сбалансированную саморегуляцию системы кровообращения отражает сердечно-сосудистый тип. Превалирование сосудистого компонента свидетельствует об экономичности и повышении функциональных резервов ССС для обеспечения долговременной адаптации. Превалирование сердечного компонента отражает напряженность функционирования ССС и обеспечения адаптации к внезапно возникающим кратковременным воздействиям возмущающих факторов окружающей среды [5, 14].

### **Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных, полученных в ходе исследования, проводилась методами описательной и аналитической статистики с использованием пакета прикладных программ “SPSS statistics 23.0” (StatSoft, USA) и медицинского онлайн-счетчика (<https://medstatistic.ru>). Количественные данные были подвергнуты анализу на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка. В связи с отклонением от нормального распределения количественные данные представлялись с указанием медианного значения (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей. Для попарных сравнений независимых выборок с типом распределения, отличающимся от нормального, использовали критерий Манна-Уитни. Частота распределения аллелей и генотипов в группе профессиональных спортсменов и контрольной группе была проанализирована с помощью теста хи-квадрат Пирсона. Использовали  $\chi^2$ -тест для проверки соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга. Результаты анализа также представляли в виде относительного риска (ОР), 95% доверительного интервала (95% ДИ) и точного уровня значимости  $p$ . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p<0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786Т>С в гене NOS3 среди молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, и профессиональных спортсменов

Молекулярно-генетическое исследование позволило определить все аллели и генотипы изучаемого полиморфизма -786Т>С в гене NOS3.

В группе молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, частота встречаемости гомозигот по дикому аллелю Т составила 0,398, гетерозигот (Т/С) - 0,455, гомозигот по мутантному аллелю С - 0,147. Частота встречаемости дикого аллеля Т составила 0,626, мутантного аллеля С - 0,374.

В группе профессиональных спортсменов частота встречаемости гомозигот по дикому аллелю Т составила 0,481, гетерозигот (Т/С) - 0,425, гомозигот по мутантному аллелю С - 0,094. Частота встречаемости дикого аллеля Т составила 0,693, мутантного аллеля С - 0,307 (рис.2).

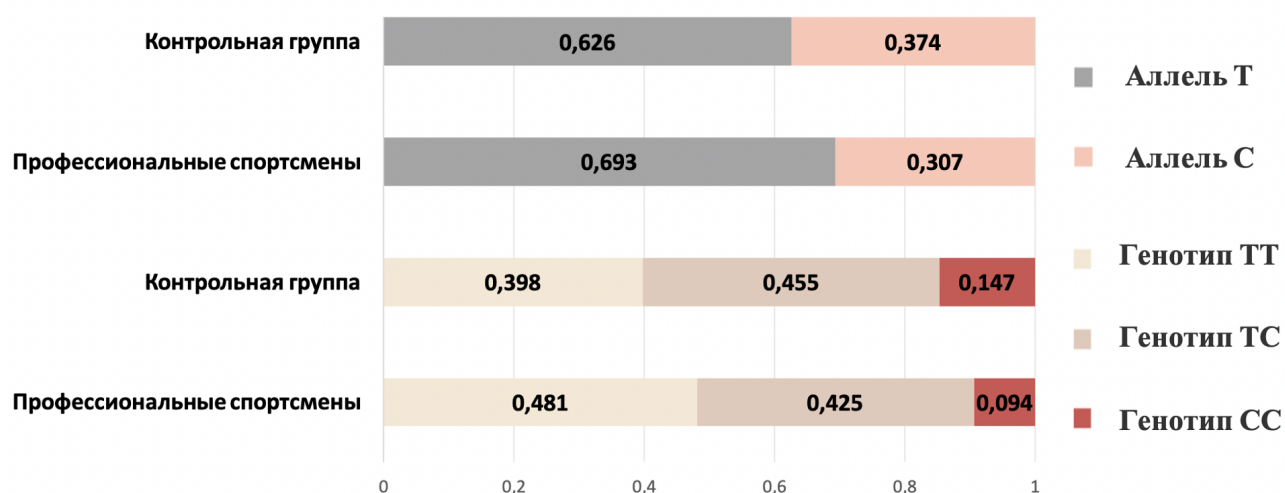


Рисунок 2 - Распространенность аллелей и генотипов полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 среди молодых людей, не занимающихся профессионально спортом (контрольная группа), и профессиональных спортсменов

Выявлено преобладание «дикого» аллеля Т полиморфизма -786Т>С в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, и в группе профессиональных спортсменов. У спортсменов полиморфный аллель С и генотип С/С встречались на 6,7 и 5,3% реже, чем у лиц, не имеющих регулярных физических нагрузок. Однако статистически значимой разницы в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфизму -786Т>С в изучаемых группах выявлено не было (табл.2).

Таблица 2 - Распространенность аллелей и генотипов полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 в группе молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, и в группе профессиональных спортсменов

Полиморфизм	Молодые люди, не занимающиеся профессионально спортом	Профессиональные спортсмены	$\chi^2$	p
	n=191	n=106		
<b>-786Т&gt;С</b>	Абсолютное число (процент)			
Аллели				
Т	239 (62,6%)	147 (69,3%)	2,749	0,098
С	143 (37,4%)	65 (30,7%)		
Генотипы				
Т/Т	76 (39,8%)	51 (48,1%)	2,706	0,259
Т/С	87 (45,5%)	45 (42,5%)		
С/С	28 (14,7%)	10 (9,4%)		

Распределение генотипов полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, и в группе профессиональных спортсменов соответствовало закону Харди-Вайнберга (табл.3).

Таблица 3 – Распределение генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, и в группе профессиональных спортсменов в зависимости от типа реакции сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку

Генотипы	Нормотонический тип реакции ССС на нагрузку				Гипертонический тип реакции ССС на нагрузку			
	N.O.	N.E.	$\chi^2$	<i>p</i>	N.O.	N.E.	$\chi^2$	<i>p</i>
<b>Лица, не занимающиеся профессионально спортом</b>								
<b>-786T&gt;C</b>	n=135				n=56			
T/T	0,393	0,420	1,171	0,557	0,411	0,326	3,784	0,151
T/C	0,511	0,456			0,321	0,490		
C/C	0,096	0,124			0,268	0,184		
<b>Профессиональные спортсмены</b>								
<b>-786T&gt;C</b>	n=98				n=8			
T/T	0,500	0,503	0,000	1,000	0,250	0,250	0,000	1,000
T/C	0,418	0,412			0,500	0,500		
C/C	0,082	0,085			0,250	0,250		

Примечание: критерий  $\chi^2$  использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов (N.O.) ожидаемому распределению генотипов (N.E.) исходя из равновесия Харди-Вайнберга.

Поиск взаимосвязи спортивной успешности с количеством аллелей -786C в генотипе спортсменов не выявил статистически значимых различий среди лиц разной спортивной квалификации (табл.4).

Таблица 4 - Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в группе спортсменов в зависимости от спортивной квалификации

Полиморфизм	Высоко-квалифицированные спортсмены (МСМК, МС, КМС)	Квалифицированные спортсмены (I, II, III разряд)	$\chi^2$	<i>p</i>
<b>-786T&gt;C</b>	Абсолютное число (процент)			
Аллели				
T	51 (75,0%)	96 (66,7%)	1,509	0,220
C	17 (25,0%)	48 (33,3%)		
Генотипы				
T/T	18 (53,0%)	33 (45,8%)	2,512	0,285
T/C	15 (44,1%)	30 (41,7%)		
C/C	1 (2,9%)	9 (12,5%)		

Стоит отметить, что в группе высококвалифицированных спортсменов полиморфный аллель С и генотип С/С встречались реже, чем в группе квалифицированных спортсменов в 1,3 и 4,3 раза соответственно (рис.3).

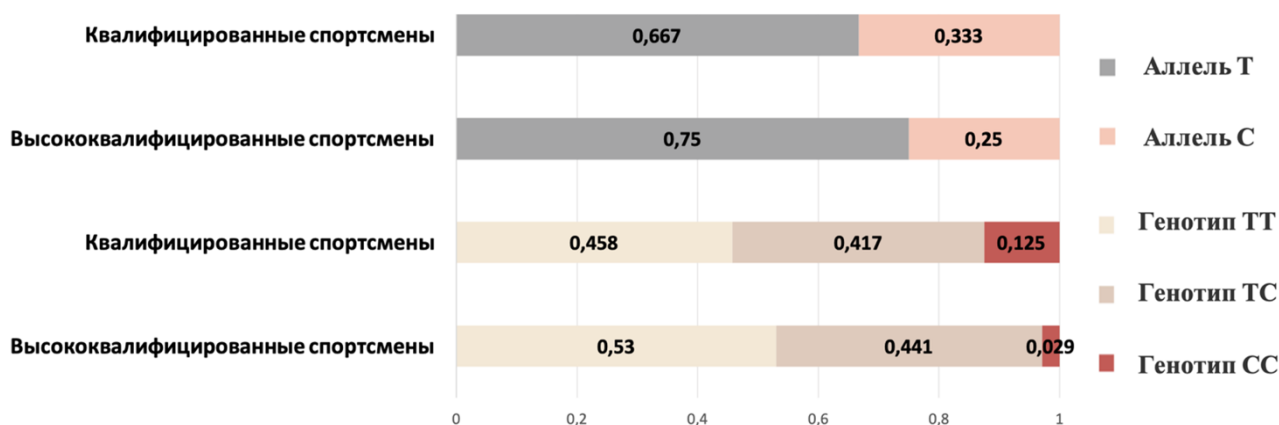


Рисунок 3 - Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в группе спортсменов в зависимости от спортивной квалификации

Результаты молекулярно-генетического исследования были сопоставлены с частотами аллелей и генотипов, представленных в общемировой базе частот аллелей в популяциях людей (The Allele Frequency Database 2019, <http://alfred.med.yale.edu>). Для жителей Архангельской области полученные результаты по распределению аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в контрольной группе лиц и в группе профессиональных спортсменов согласуются с данными, представленными для европейской популяции. У европейцев (смешанные группы, немцы, итальянцы) частота аллеля С колеблется от 0,296 до 0,420, а частота гетерозигот – 0,420-0,490. Распространенность полиморфизма -786T>C гена NOS3 в русских популяциях в базе ALFRED (2019) не представлена.

### **3.2. Анализ полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом**

#### **3.2.1. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с уровнем вазоактивных эндотелиальных факторов в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом**

В группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, медиана уровня NO составила 21,250 мкмоль/л (Q1-Q3: 17,320-24,950), уровня ЭТ-1 – 0,450 фмоль/мл (Q1-Q3: 0,270-0,956), уровня АТ II – 66,900 пг/мл (Q1-Q3: 59,100-75,800) и отношения NO/ЭТ-1 – 51,556 (Q1-Q3: 20,309-85,441).

В результате статистического анализа в данной группе лиц установлена ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с дисбалансом вазоактивных эндотелиальных факторов в сторону вазоконстрикторов. Выявлена статистически значимая разница в уровне эндотелина 1 у лиц с разными генотипами по изучаемому полиморфизму. Так, в таблице 5 показано, что медиана уровня эндотелина 1 у лиц с генотипом С/С в 2 раза выше, чем соответствующий показатель для лиц с генотипами Т/Т ( $p=0,003$ , критерий



Манна-Уитни  $U=607,000$ ) и Т/С ( $p=0,006$ , критерий Манна-Уитни  $U=702,500$ ), однако находится в пределах референсных значений эндотелина (до 1,03 фмоль/мл). Статистически значимой разницы в показателях уровня ЭТ-1 между генотипами Т/Т и Т/С обнаружено не было (рис.4).

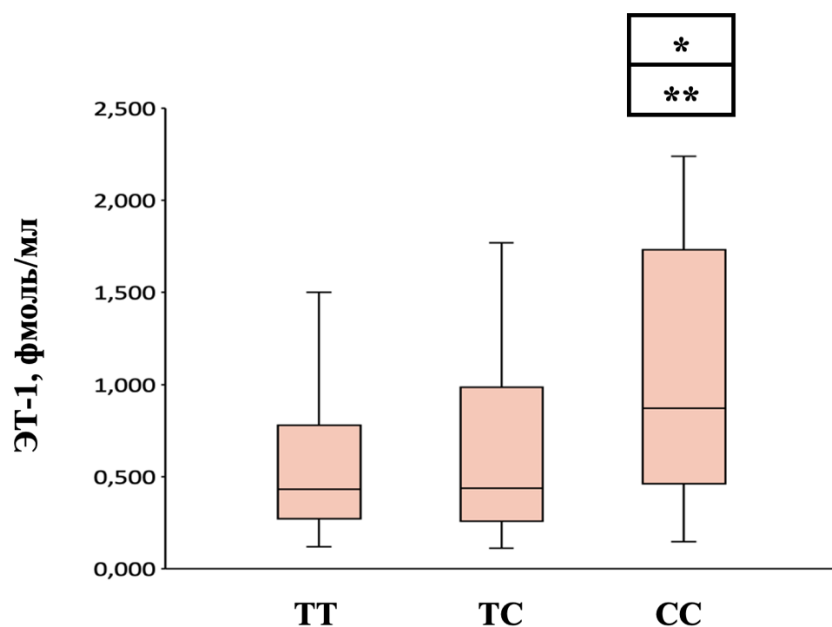


Рисунок 4 - Сравнение уровня ЭТ-1 в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786Т>С в контрольной группе лиц, не занимающихся профессионально спортом

Примечание: \* - статистически значимые различия между группой ТТ и СС, \*\* - статистически значимые различия между группой ТС и СС.

Таблица 5 - Продукция вазоактивных факторов у молодых людей, не занимающихся профессионально спортом, с различными генотипами по полиморфизму -786Т>С гена NOS3, Me (Q1;Q3)

Показатель	Т/Т (1)	Т/С (2)	С/С (3)	Значимость различий (p)
NO	21,797	20,968	22,433	(1-2) 0,321
мкмоль/л	(17,339; 25,656)	(16,369; 24,267)	(18,435; 25,167)	(1-3) 0,673 (2-3) 0,206

ЭТ-1 фмоль/мл	0,431 (0,265; 0,800)	0,437 (0,256; 0,992)	0,872 (0,441; 1,878)	(1-2) 0,948 <b>(1-3) 0,003</b> <b>(2-3) 0,006</b>
АТ II нг/мл	65,000 (59,100; 73,400)	67,200 (58,500; 76,850)	73,800 (65,900; 78,600)	(1-2) 0,368 (1-3) 0,055 (2-3) 0,207
NO/ЭТ-1	49,831 (23,295; 106,913)	59,137 (21,832; 85,654)	24,622 (14,236; 65,256)	(1-2) 0,689 (1-3) 0,101 <b>(2-3) 0,050</b>

Индивидуальный анализ уровня эндотелина 1 в плазме крови показал, что вклад в повышение концентрации данного показателя вносит само наличие аллеля С в генотипе, а не только его гомозиготное состояние (рис.5). Так, у лиц контрольной группы с аллелем С в 1,6 раза чаще, чем у носителей генотипа Т/Т, встречался уровень ЭТ-1 выше референсных значений ( $\chi^2=4,971$ ,  $p=0,026$ , OR=1,632; 95% ДИ: 1,060 - 2,512) (табл.6).

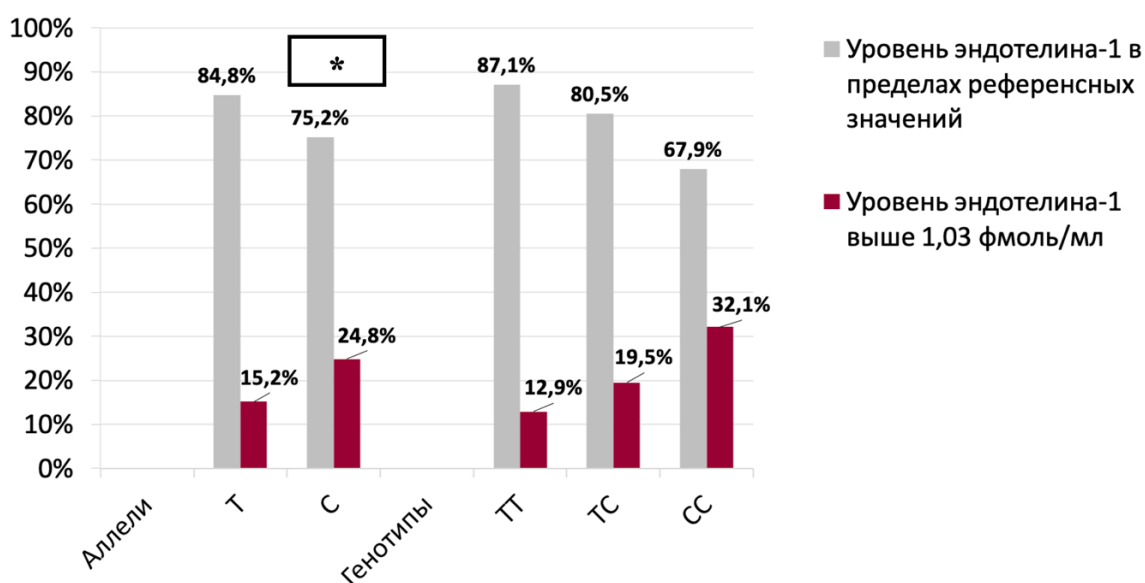


Рисунок 5 - Сравнение уровня ЭТ-1 в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786Т>С гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом

Примечание: \* - статистически значимый результат при расчете ОР.

Таблица 6 - Сравнение уровня ЭТ-1 в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786Т>С гена NOS3 в контрольной группе лиц

Уровень эндотелина 1 в плазме крови	Аллели		Генотипы		
	Т	С	Т/Т	Т/С	С/С
Менее или равно 1,03 фмоль/мл (n=142)	184 (84,8%)	100 (75,2%)	61 (87,1%)	62 (80,5%)	19 (67,9%)
Более 1,03 фмоль/мл (n=33)	33 (15,2%)	33 (24,8%)	9 (12,9%)	15 (19,5%)	9 (32,1%)
$\chi^2$	4,971		4,896		
p	<b>0,026</b>		0,087		
ОР (95% ДИ)	0,613 (0,398; 0,944)	<b>1,632</b> <b>(1,060;</b> <b>2,512)</b>	0,563 (0,278; 1,137)	1,061 (0,572; 1,965)	1,969 (1,027; 3,774)

Выявлены статистически значимые различия в величине отношения NO/ЭТ-1 для лиц с генотипами Т/С и С/С (табл.5). У носителей генотипа С/С индекс NO/ЭТ-1 в 2,4 раза ниже, чем у лиц с генотипом Т/С (p=0,050, критерий Манна-Уитни U=440,000), что свидетельствует в пользу преобладания вазоконстрикции над вазодилатацией у гомозигот по аллелю С (рис.6).

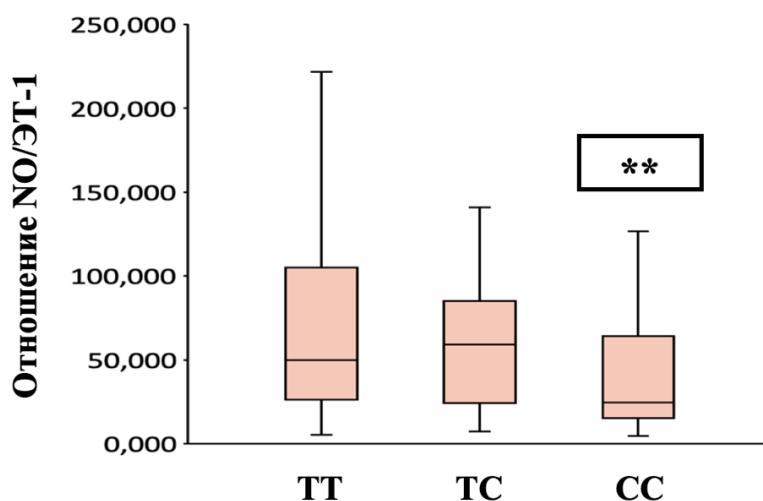


Рисунок 6 - Сравнение индекса NO/ЭТ-1 в зависимости от генотипа полиморфизма -786Т>С гена NOS3 в контрольной группе лиц

Примечание: \*\* - статистически значимые различия среди групп ТС и СС.

Уровни NO и АТ II в плазме крови лиц с разными генотипами по полиморфизму -786Т>С гена NOS3 статистически значимо не различались.

Стоит отметить, что медиана уровня NO для всех 3-х генотипов находилась в пределах референсных значений уровня оксида азота в плазме крови (10-92 мкмоль/л) (рис.7).

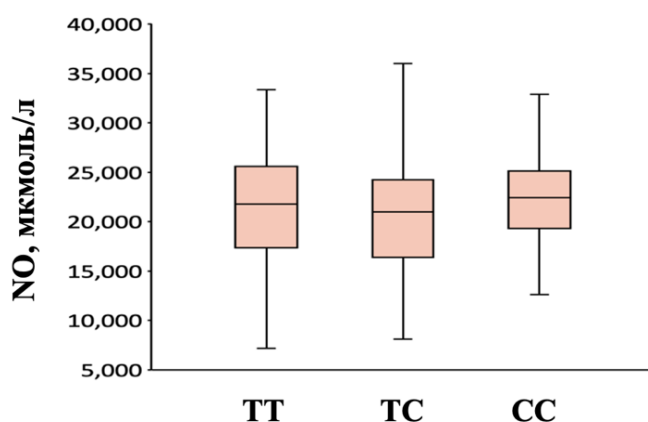


Рисунок 7 - Сравнение уровня NO в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C гена NOS3 в контрольной группе лиц

Медиана уровня АТ II для всех 3-х генотипов по полиморфизму -786T>C была выше референсных значений АТ II в плазме крови (10-60 пг/мл). Наблюдалась тенденция повышения концентрации АТ II в плазме крови с увеличением числа аллелей -786C в генотипе (рис.8).

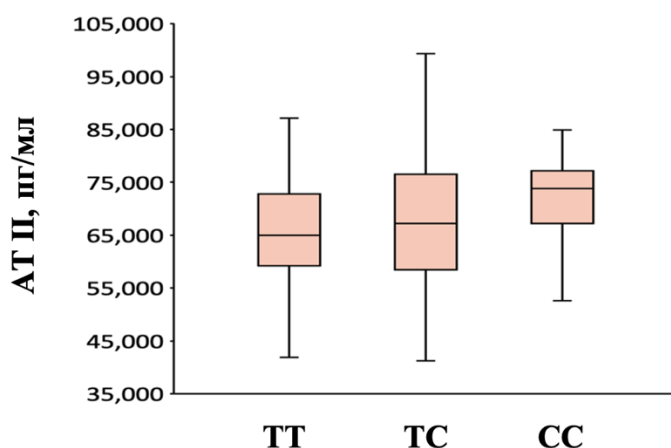


Рисунок 8 - Сравнение уровня АТ II в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C гена NOS3 в контрольной группе лиц

Сравнение уровня NO, ЭТ-1 и индекса соотношения NO/ЭТ-1 в контрольной группе лиц среди генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 не показало статистически значимых различий по отношению к типу реакции

сердечно-сосудистой системы на дозированную физическую нагрузку (приложение 1, табл.12).

Уровень ангиотензина II в группе лиц с генотипом Т/Т был статистически значимо выше в подгруппе с гипертонической гемодинамической реакцией по отношению к подгруппе с нормотонической реакцией ( $p=0,013$ , критерий Манна-Уитни  $U=71,000$ ) (рис.9). Для остальных генотипов статистически значимой разницы в уровне ангиотензина II выявлено не было. Полученный результат, вероятно, связан с тем, что у лиц-носителей генотипа -786Т/Т с гипертонической реакцией на нагрузку имеет место полиморфизм генов RAS, оказывающих влияние на периферическую вазоконстрикцию.

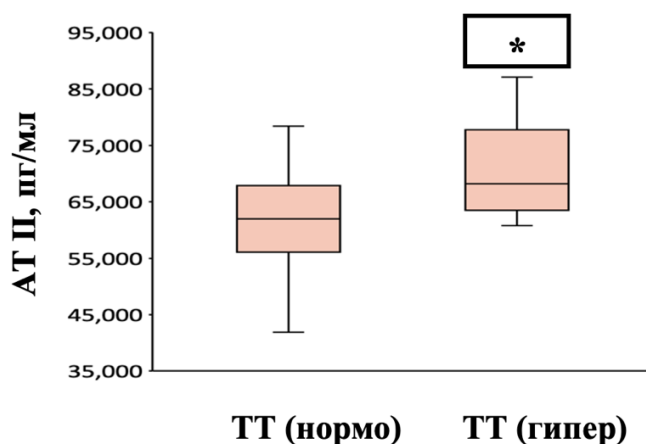


Рисунок 9 - Сравнение плазменной концентрации АТ II в контрольной группе лиц с генотипом -786ТТ, в зависимости от типа реакции ССС на дозированную физическую нагрузку

Примечание: \* - статистически значимые различия между группами.

### **3.2.2. Ассоциация полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 с типом гемодинамической реакции на дозированную физическую нагрузку в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом**

В результате генотипирования полиморфизма -786Т>С гена NOS3 у лиц, не занимающихся профессионально спортом (табл.3) выявлено, что в подгруппе с нормотоническим типом реакции ССС на нагрузку и в подгруппе с гипертоническим типом реакции аллель Т встречался чаще аллеля С.

В целом в контрольной группе лиц частота встречаемости гипертонической реакции составила 29,3%.

Выявлена ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом реакции ССС на дозированную физическую нагрузку: у лиц с генотипом С/С гипертонический тип реакции на физическую нагрузку встречался чаще по сравнению с нормотоническим типом реакции (рис.10).

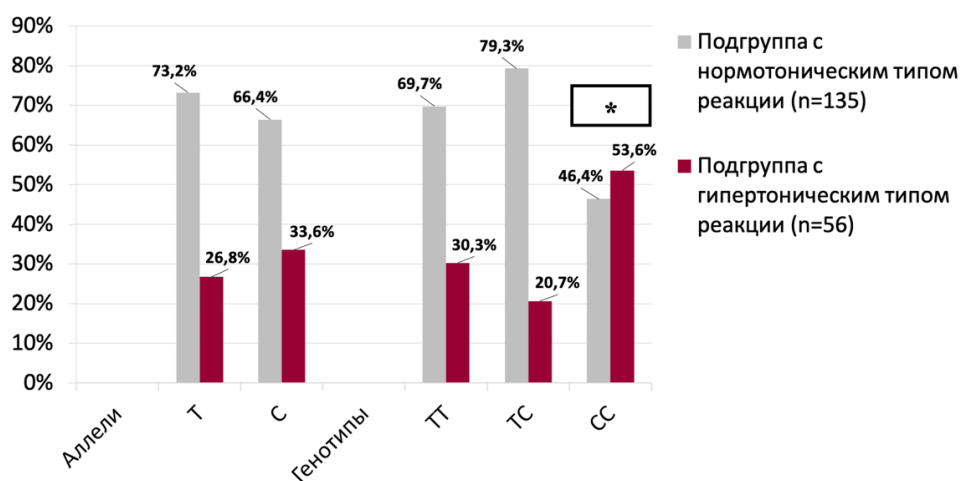


Рисунок 10 - Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, в зависимости от типа реакции ССС на физическую нагрузку

Примечание: \* - статистически значимый результат при расчете ОР.

Таблица 7 - Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, в зависимости от типа реакции ССС на физическую нагрузку

Тип реакции ССС	Аллели		Генотипы		
	T	C	T/T	T/C	C/C
Нормотонический тип (n=135)	175 (73,2%)	95 (66,4%)	53 (69,7%)	69 (79,3%)	13 (46,4%)
Гипертонический тип (n=56)	64 (26,8%)	48 (33,6%)	23 (30,3%)	18 (20,7%)	15 (53,6%)
$\chi^2$	1,989		11,106		
p	0,159		<b>0,004</b>		
ОР (95% ДИ)	0,798 (0,584; 1,089)	1,253 (0,918; 1,712)	1,055 (0,675; 1,648)	0,566 (0,349; 0,918)	<b>2,130</b> <b>(1,379; 3,290)</b>

У лиц с генотипом С/С в 2 раза повышается риск гипертонической гемодинамической реакции на физическую нагрузку, в отличие от лиц, имеющих генотипы Т/Т и Т/С ( $\chi^2=11,106$ ,  $p=0,004$ ,  $OR=2,130$ ; 95% ДИ: 1,379 - 3,290) (табл.7).

### 3.2.3. Ассоциация полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 с типом саморегуляции кровообращения в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом

По результатам проведенных расчетов выявлено, что в контрольной группе лиц 27,2% имели сердечный ТСК, 40,3% - смешанный, 32,5% - сосудистый. Не установлено статистически значимой разницы в распределении аллелей и генотипов полиморфизма -786Т>С гена NOS3 в зависимости от типа саморегуляции кровообращения в контрольной группе лиц (табл.8). Для всех 3-х генотипов преобладающим являлся сердечно-сосудистый (смешанный) – наиболее оптимальный тип саморегуляции кровообращения.

Таблица 8 - Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3 в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом, в зависимости от типа саморегуляции кровообращения

Тип саморегуляции кровообращения	Аллели		Генотипы		
	Т	С	Т/Т	Т/С	С/С
Сердечный (n=52)	62 (25,9%)	42 (29,4%)	19 (25,0%)	24 (27,6%)	9 (32,1%)
Смешанный (n=77)	97 (40,6%)	57 (39,8%)	30 (39,5%)	37 (42,5%)	10 (35,8%)
Сосудистый (n=62)	80 (33,5%)	44 (30,8%)	27 (35,5%)	26 (29,9%)	9 (32,1%)
$\chi^2$	0,600		1,056		
p	0,741		0,902		

### 3.3. Анализ полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в группе профессиональных спортсменов

#### 3.3.1. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с уровнем вазоактивных эндотелиальных факторов в группе профессиональных спортсменов

В группе профессиональных спортсменов медиана уровня NO составила 25,020 мкмоль/л (Q1-Q3: 18,908-26,925), уровня ЭТ-1 – 0,389 фмоль/мл (Q1-Q3: 0,333-0,486), уровня АТ II – 61,000 пг/мл (Q1-Q3: 57,500-65,000) и отношения NO/ЭТ-1 – 60,188 (Q1-Q3: 46,603-75,527).

Статистически значимой разницы в уровнях вазоактивных факторов (оксида азота, эндотелина-1 и ангиотензина II), а также индекса соотношения NO к ЭТ-1 у спортсменов с различными генотипами по полиморфизму -786T>C гена NOS3 выявлено не было (табл.9).

Таблица 9 - Продукция вазоактивных факторов у спортсменов с различными генотипами по полиморфизму -786T>C гена NOS3, Me (Q1;Q3)

Показатель	T/T (1)	T/C (2)	C/C (3)	Значимость различий (p)
NO мкмоль/л	24,645 (18,495; 27,350)	25,203 (19,343; 26,161)	25,878 (20,208; 27,559)	(1-2) 0,605 (1-3) 0,708 (2-3) 0,417
ЭТ-1 фмоль/мл	0,388 (0,328; 0,468)	0,389 (0,334; 0,491)	0,433 (0,324; 0,504)	(1-2) 0,800 (1-3) 0,740 (2-3) 0,851
АТ II пг/мл	58,500 (57,500; 65,000)	61,000 (57,500; 68,750)	62,500 (62,500; 72,500)	(1-2) 0,517 (1-3) 0,284 (2-3) 0,396



NO/ЭТ-1	62,117 (42,514; 83,562)	61,396 (48,904; 74,595)	55,743 (49,164; 67,782)	(1-2) 0,764 (1-3) 0,675 (2-3) 0,582
---------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	---

Медиана уровня NO в плазме крови спортсменов для всех 3-х генотипов находилась в пределах референсных значений (10-92 мкмоль/л) (рис.11).

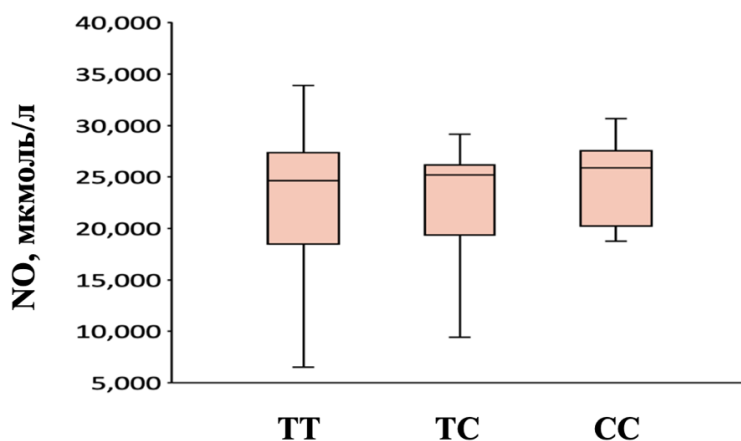


Рисунок 11 - Сравнение уровня NO в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C в группе профессиональных спортсменов

Медиана уровня ЭТ-1 в плазме крови спортсменов для всех 3-х генотипов находилась в пределах референсных значений (до 1,03 фмоль/мл). Прослеживается тенденция к увеличению уровня ЭТ-1 в плазме крови с увеличением числа аллелей -786C в генотипе (рис.12). Не зафиксировано ни одного случая превышения плазменной концентрации ЭТ-1 > 1,03 фмоль/мл.

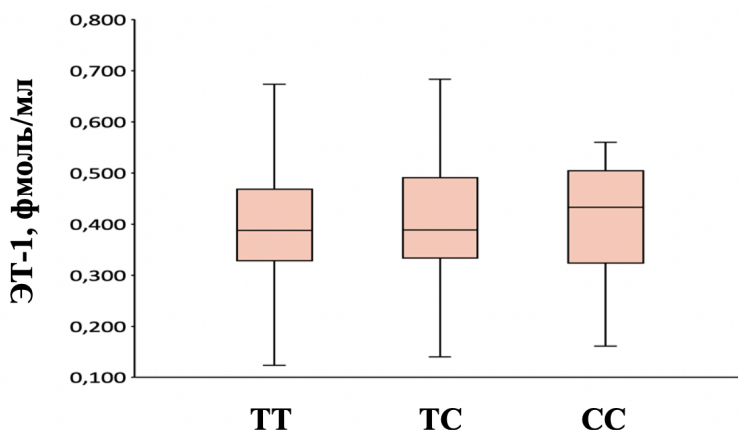


Рисунок 12 - Сравнение уровня ЭТ-1 в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C в группе профессиональных спортсменов

Медианный уровень ангиотензина II в плазме крови спортсменов с генотипами T/C и C/C был незначительно выше верхней границы референсных значений (10-60 пг/мл). Прослеживается тенденция к увеличению уровня АТ II в плазме крови с увеличением числа аллелей -786C в генотипе (рис.13).

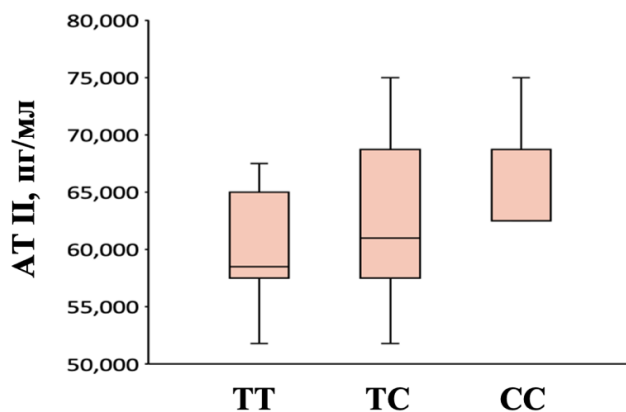


Рисунок 13 - Сравнение уровня АТ II в плазме крови в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C в группе профессиональных спортсменов

Отмечена тенденция к уменьшению значения индекса NO/ЭТ-1 с увеличением числа аллелей -786C в генотипе спортсмена, однако статистически значимой ассоциации генотипа C/C с дисбалансом вазоактивных факторов выявлено не было (рис.14).

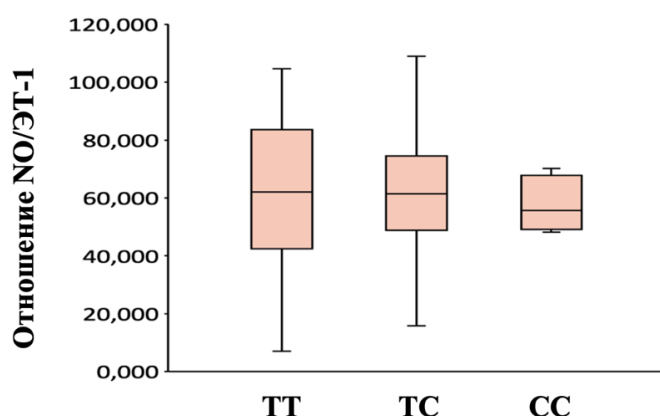


Рисунок 14 - Сравнение индекса отношения NO/ЭТ-1 в зависимости от генотипа полиморфизма -786T>C в группе профессиональных спортсменов

Сравнительный статистический анализ уровня вазоактивных факторов в плазме крови лиц, не занимающихся профессионально спортом, и профессиональных спортсменов представлен в приложении 2 (табл.13).

Выявлено, что спортсмены с генотипом -786Т/С имели уровень вазодилататора NO в плазме крови в 1,2 раза выше, чем лица с таким же генотипом, не имеющие регулярных физических нагрузок ( $p=0,026$ , критерий Манна-Уитни  $U=778,000$ ) (рис.15).

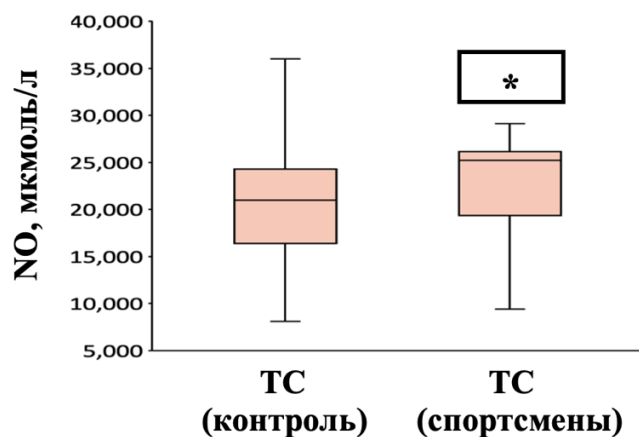


Рисунок 15 - Сравнение плазменной концентрации NO у лиц с генотипом -786ТС в зависимости от наличия регулярной физической нагрузки

Примечание: \* - статистически значимые различия между группами.

Установлено, что спортсмены с генотипом -786С/С имели уровень вазоконстриктора эндотелина-1 в плазме крови в 2 раза ниже, чем лица с таким же генотипом, не имеющие регулярных физических нагрузок ( $p=0,007$ , критерий Манна-Уитни  $U=60,000$ ) (рис.16).

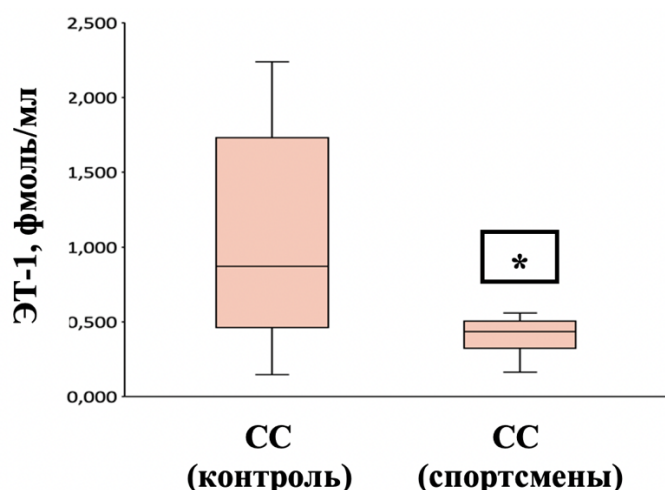


Рисунок 16 - Сравнение плазменной концентрации ЭТ-1 у лиц с генотипом -786СС в зависимости от наличия регулярной физической нагрузки

Примечание: \* - статистически значимые различия между группами.

### 3.3.2. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом гемодинамической реакции на дозированную физическую нагрузку в группе профессиональных спортсменов

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 среди спортсменов методом расчета относительного риска и точного уровня значимости различий  $p$  не выявил ассоциации с гипертоническим типом реакции на дозированную физическую нагрузку (табл.10). В целом по группе спортсменов частота встречаемости гипертонической реакции на дозированную физическую нагрузку составила 7,5%, что в 4 раза ниже, чем соответствующий показатель в группе лиц, не занимающихся профессионально спортом.

Таблица 10 - Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в группе спортсменов в зависимости от реакции ССС на нагрузку

Тип реакции ССС	Аллели		Генотипы		
	Т	С	Т/Т	Т/С	С/С
Нормотонический тип (n=98)	139 (94,6%)	57 (87,7%)	49 (96,1%)	41 (91,1%)	8 (80,0%)
Гипертонический тип (n=8)	8 (5,4%)	8 (12,3%)	2 (3,9%)	4 (8,9%)	2 (20,0%)
$\chi^2$	3,045		3,299		
$p$	0,082		0,193		
ОР (95% ДИ)	0,442 (0,174; 1,127)	2,262 (0,887; 5,764)	0,359 (0,076; 1,701)	1,356 (0,358; 5,132)	3,200 (0,742; 13,804)

### 3.3.3. Ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом саморегуляции кровообращения в группе профессиональных спортсменов

По результатам проведенных расчетов, выявлено, что 34,0% спортсменов имели сердечный ТСК, 42,4% - смешанный ТСК, 23,6% - сосудистый ТСК. Не установлено статистически значимой разницы в распределении аллелей и

генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в зависимости от типа саморегуляции кровообращения среди спортсменов (табл.11).

Таблица 11 - Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 у спортсменов в зависимости от типа саморегуляции кровообращения

Тип саморегуляции кровообращения	Аллели		Генотипы		
	T	C	T/T	T/C	C/C
Сердечный (n=36)	53 (36,1%)	19 (29,2%)	18 (35,3%)	17 (37,8%)	1 (10,0%)
Смешанный (n=45)	61 (41,5%)	29 (44,6%)	20 (39,2%)	21 (46,7%)	4 (40,0%)
Сосудистый (n=25)	33 (22,4%)	17 (26,2%)	13 (25,5%)	7 (15,5%)	5 (50,0%)
$\chi^2$	0,983		6,506		
p	0,612		0,165		

Отметим, что у спортсменов с генотипом -786C/C по сравнению с лицами контрольной группы, имеющими такой же генотип, преобладал сосудистый компонент саморегуляции кровообращения (50,0% и 32,1% соответственно), свидетельствующий об экономичности и повышении функциональных резервов сердца и сосудов для обеспечения долговременной адаптации (рис.17).

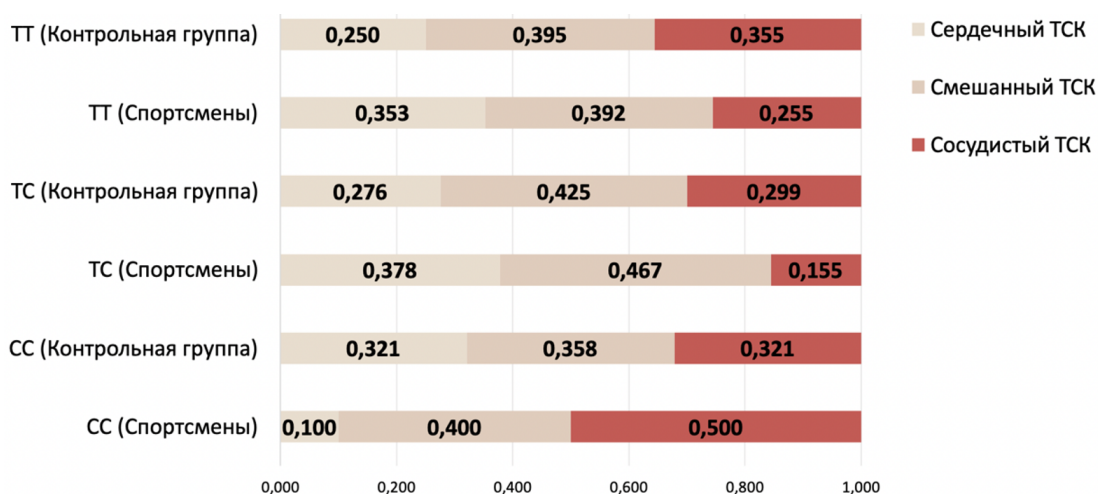


Рисунок 17 - Распределение типов саморегуляции кровообращения в контрольной группе и группе спортсменов в зависимости от генотипа полиморфного варианта -786T>C гена NOS3

## Заключение

Перспективным подходом для выделения групп повышенного риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы является анализ полиморфизма генов-кандидатов. Одним из таких генов является ген синтазы оксида азота (NOS), а именно его эндотелиальная изоформа – NOS3. Ген NOS3 определяет выработку оксида азота в эндотелиоцитах, обеспечивая базальный тонус сосудов.

В настоящее время ведется активное изучение генетической природы торможения экспрессии и активности NOS3. Ген, кодирующий синтез фермента NOS3, расположен в локусе 7q36, состоит из 26 экзонов и включает 21 тыс. пар нуклеотидов. В экзонах и интронах данного гена расположено несколько полиморфных участков, от которых зависит активность NOS3 и, соответственно, уровень NO в крови [34].

Достаточно большое количество мировых исследований посвящено взаимосвязи полиморфизма гена NOS3 с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе с артериальной гипертензией [1, 47, 50, 53, 59, 60, 62]. Большая часть подобных исследований оценивает полиморфизм гена NOS3 как фактор риска развития ССЗ у людей с уже диагностированной кардиоваскулярной патологией. Данный факт не позволяет оценить перспективы использования полиморфизма гена NOS3 в качестве раннего маркера развития артериальной гипертензии, являющейся одной из ведущих причин инвалидности и смертности населения по всему миру.

Одним из наиболее изучаемых полиморфных вариантов гена NOS3 является полиморфизм -786Т>С (rs2070744). Он представляет собой SNP-мутацию в промоторе гена NOS3, в частности замену тимина на цитозин, приводящую к значительному снижению (до 50-52%) активности фермента NOS3 и снижению уровня NO в крови [34]. «Диким» вариантом полиморфизма является генотип Т/Т.

У лиц, имеющих в генотипе хотя бы один аллель -786С установлено снижение экспрессии гена NOS3 и последующий низкий уровень мРНК и нитратов / нитритов в сыворотке крови [31]. В то же время имеются сведения об отсутствии ассоциации полиморфизма -786Т>С гена eNOS с изменением уровня оксида азота и с развитием сердечно-сосудистых заболеваний [44, 57].

В ходе мировых экспериментальных и клинических исследований показано, что в патогенезе артериальной гипертензии и атеросклеротических изменений важную роль играет эндотелиальная дисфункция в крупных и резистивных сосудах. Дисфункция эндотелия связана с нарушением равновесия в системе выработки вазоконстрикторов и вазодилататоров, про- и антикоагулянтов, факторов роста и их ингибиторов. Несмотря на то, что механизмы эндотелиальной дисфункции окончательно не выяснены, на данный момент ведущая роль в ее патогенезе отводится именно снижению активности NOS3, что приводит к уменьшению продукции NO, которая в физиологических условиях преобладает над секрецией ЭТ-1 и поддерживает базальный тонус сосудов [32].

В немногочисленных исследованиях описываемый полиморфизм изучался в группе молодых практически здоровых людей. Выявлено, что аллель -786Т чаще встречался в группе спортсменов и был ассоциирован с более высокими скоростно-силовыми показателями в сравнении с показателями лиц, не имеющих регулярной физической нагрузки [35]. Однако большая часть исследований оценивает полиморфизм -786Т>С у лиц в средней и пожилой возрастной группе с уже диагностированной сердечно-сосудистой патологией [45, 49].

Раннее выявление вазоконстрикции позволит проводить своевременные профилактические мероприятия по снижению риска развития ССЗ. В связи с этим значимыми являются исследования молодых людей без выявленной кардиоваскулярной патологии с полиморфизмом гена NOS3 с позиции изучения баланса вазоактивных эндотелиальных факторов и вариабельности

гемодинамических показателей и, в частности, разработка новых геноспецифических методов кардиопротекции в спорте.

В ходе выполнения работы было обследовано 297 человек, из них 106 профессиональных спортсменов (средний возраст - 18,1 лет; 95% ДИ: 18,0-18,3) и 191 человек контрольной группы - практически здоровые лица, не занимающиеся профессионально спортом (средний возраст - 18,6 лет; 95% ДИ: 18,5-18,7).

Для всех обследуемых проведено молекулярно-генетическое типирование полиморфизма -786T>C гена NOS3 с помощью набора «SNP-экспресс-кардиогенетика, Литех» в режиме реального времени. Биохимическим методом в реакции Грисса с помощью набора группы «BCM Биохиммак» - «Total NO/Nitrite/Nitrate Assay» определено содержание в плазме крови оксида азота по суммарной концентрации его стабильных метаболитов (нитратов, нитритов). Методом иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора «Quantikine ELISA Endothelin-1 Immunoassay» группы «BCM Биохиммак» определено содержание эндотелина-1 в плазме крови всех обследуемых. Для выявления дисбаланса вазоактивных эндотелиальных факторов произведен расчет индекса соотношения вазодилататор/вазоконстриктор (NO/ЭТ-1). Методом иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора «AssayMax Human Angiotensin II ELISA Kit» группы «BCM Биохиммак» определено содержание ангиотензина II в плазме крови всех обследуемых. Способность сердечно-сосудистой системы к восстановлению после дозированной физической нагрузки определялась с помощью пробы Мартине-Кушелевского (20 приседаний за 30 секунд), в зависимости от результатов которой у обследуемых выявлялся нормотонический или прогностически неблагоприятный в плане развития АГ гипертонический тип реакции ССС на нагрузку. Кроме того, расчетным путем у обследуемых был определен тип саморегуляции кровообращения, отражающий особенности адаптивно-приспособительных реакций организма человека. Статистическая обработка данных, полученных в



ходе исследования, проводилась методами описательной и аналитической статистики с использованием пакета прикладных программ “SPSS statistics 23.0” (StatSoft, USA) и медицинского онлайн-счетчика (<https://medstatistic.ru>).

Распределение генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 в контрольной группе и в группе профессиональных спортсменов соответствовало закону Харди-Вайнберга. В обеих группах выявлено преобладание «дикого» аллеля T полиморфизма -786T>C. У спортсменов полиморфный аллель C и генотип C/C встречались на 6,7 и 5,3% реже, чем у лиц, не имеющих регулярных физических нагрузок. Статистически значимой разницы в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфизму -786T>C в изучаемых группах не выявлено.

Полученные результаты по распределению аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в контрольной группе и в группе профессиональных спортсменов – жителей Архангельской области согласуются с данными, представленными в генетических базах данных для европейской популяции.

В группе высококвалифицированных спортсменов полиморфный аллель C и генотип C/C встречались реже, чем в группе квалифицированных спортсменов в 1,3 и 4,3 раза соответственно. Однако, поиск взаимосвязи спортивной успешности с количеством аллелей -786C в генотипе спортсменов не выявил статистически значимых различий среди лиц разной спортивной квалификации.

В контрольной группе лиц установлена ассоциация полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с дисбалансом вазоактивных эндотелиальных факторов в сторону вазоконстрикторов. Медиана уровня эндотелина 1 у лиц с генотипом C/C в 2 раза выше, чем соответствующий показатель для лиц с генотипами T/T и T/C. В ходе индивидуального анализа уровня эндотелина 1 в плазме крови лиц контрольной группы показано, что вклад в повышение концентрации данного показателя вносит само наличие аллеля C в генотипе, а не только его гомозиготное состояние.

В контрольной группе лиц выявлено, что у носителей генотипа С/С индекс NO/ЭТ-1 в 2,4 раза ниже, чем у лиц с генотипом Т/С, что свидетельствует в пользу преобладания вазоконстрикции над вазодилатацией у гомозигот по аллелю С.

Уровни NO и АТ II в плазме крови лиц контрольной группы с разными генотипами по полиморфизму -786Т>С гена NOS3 статистически значимо не различались, однако, наблюдалась тенденция повышения концентрации АТ II в плазме крови с увеличением числа аллелей -786С в генотипе.

Сравнение уровня NO, ЭТ-1 и индекса соотношения NO/ЭТ-1 в контрольной группе лиц среди генотипов полиморфизма -786Т>С гена NOS3 не показало статистически значимых различий по отношению к типу реакции сердечно-сосудистой системы на дозированную физическую нагрузку. Уровень ангиотензина II в группе лиц с генотипом Т/Т был статистически значимо выше в подгруппе с гипертонической гемодинамической реакцией по отношению к подгруппе с нормотонической реакцией. Данный факт, вероятно, связан с тем, что у лиц-носителей генотипа -786Т/Т с гипертонической реакцией на нагрузку имеет место полиморфизм генов RAS, оказывающих влияние на периферическую вазоконстрикцию.

В группе профессиональных спортсменов с различными генотипами по полиморфизму -786Т>С гена NOS3 статистически значимой разницы в уровнях вазоактивных факторов (оксида азота, эндотелина-1 и ангиотензина II), а также индекса соотношения NO к ЭТ-1 выявлено не было.

Установлено, что спортсмены с генотипом -786Т/С имели уровень вазодилататора NO в плазме крови в 1,2 раза выше, чем лица контрольной группы с таким же генотипом.

Выявлено, что спортсмены с генотипом -786С/С имели уровень вазоконстриктора эндотелина-1 в плазме крови в 2 раза ниже, чем лица контрольной группы с таким же генотипом.

В контрольной группе выявлена ассоциация генотипа -786С/С гена NOS3 с гипертоническим типом реакции ССС на дозированную физическую

нагрузку. В группе профессиональных спортсменов ассоциации аллелей и генотипов полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 с типом реакции на дозированную физическую нагрузку не установлено.

Не выявлено статистически значимой разницы в распределении аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в зависимости от типа саморегуляции кровообращения в контрольной группе лиц. Для всех 3-х генотипов преобладающим являлся сердечно-сосудистый (смешанный) – наиболее оптимальный ТСК.

Среди спортсменов также не выявлено статистически значимой разницы в распределении аллелей и генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в зависимости от типа саморегуляции кровообращения. Однако у спортсменов с генотипом -786C/C по сравнению с лицами контрольной группы, имеющими такой же генотип, преобладал сосудистый компонент саморегуляции кровообращения, свидетельствующий об экономичности и повышении функциональных резервов ССС для обеспечения долговременной адаптации.

Таким образом, в результате исследования было показано, что полиморфный аллель -786C и генотип -786C/C гена NOS3 не приводят к дисбалансу вазоактивных эндотелиальных факторов в плазме крови и формированию гипертонической гемодинамической реакции на физическую нагрузку у лиц, регулярно занимающихся спортом. Ассоциации аллеля -786C и генотипа -786C/C с вышеупомянутыми факторами риска артериальной гипертензии установлены только для лиц контрольной группы, не имеющих регулярной физической нагрузки. Регулярные занятия спортом у лиц с генотипом -786C/C гена NOS3 взаимосвязаны с изменением типа саморегуляции кровообращения в сторону большей экономизации, а также включением адаптационных механизмов и, вероятно, изменением чувствительности рецепторов к эндотелину-1, что приводит к его более низкому уровню в плазме крови спортсменов по сравнению с лицами, не занимающимися профессионально спортом.

## Выводы

1. Преобладающими генотипами как у лиц контрольной группы (не имеющих регулярной физической нагрузки), так и у профессиональных спортсменов были генотипы, содержащие «дикий» аллель -786Т. Гомозиготы по «мутантному» аллелю С в группе спортсменов встречались реже, чем в контрольной группе (9,4% и 14,7% соответственно).

2. У лиц контрольной группы с генотипом -786С/С уровень вазоконстриктора эндотелина-1 в 2 раза выше, а индекс вазодилататор (NO) / вазоконстриктор (ЭТ-1) в 2 раза ниже, чем у гетерозигот и гомозигот -786Т/Т, что свидетельствует о формировании дисбаланса вазоактивных факторов в сторону констрикторных у гомозигот -786С/С. Кроме того, у лиц контрольной группы с аллелем -786С в 1,6 раза чаще, чем у носителей генотипа -786Т/Т, встречался уровень ЭТ-1 выше референсных значений.

3. У спортсменов наличие в генотипе аллеля -786С гена NOS3 не сопровождалось дисбалансом вазоактивных факторов в плазме крови. Установлено, что спортсмены с генотипом -786С/С имели уровень вазоконстриктора эндотелина-1 в плазме крови в 2 раза ниже, чем лица с таким же генотипом, не имеющие регулярных физических нагрузок.

4. В исследуемых группах не обнаружено ассоциации уровня NO с генотипами полиморфного варианта -786Т>С гена NOS3. Однако выявлено, что спортсмены с генотипом -786Т/С имели уровень вазодилататора NO в плазме крови в 1,2 раза выше, чем лица с таким же генотипом, не имеющие регулярных физических нагрузок.

5. Для лиц контрольной группы установлена ассоциация генотипа -786С/С гена NOS3 с риском развития гипертонической реакции на дозированную физическую нагрузку, в то время как у спортсменов наличие генотипа -786С/С гена NOS3 не ассоциировано с подобной реакцией.

6. У спортсменов с генотипом -786С/С гена NOS3 преобладал более экономичный сосудистый тип саморегуляции кровообращения (50%), в то

время как в контрольной группе лиц среди носителей генотипа -786С/С доля данного типа саморегуляции кровообращения составляла 32%.

## Практические рекомендации

1. Для выявления лиц, склонных к формированию гипертонической реакции сердечно-сосудистой системы на нагрузку, а в дальнейшем и к развитию артериальной гипертензии, следует дополнительно проводить пробу с дозированной физической нагрузкой и определять концентрацию ЭТ-1 в плазме крови.
2. Проводить типирование полиморфного варианта -786T>C гена NOS3 у лиц с гипертоническим типом реакции сердечно-сосудистой системы на дозированную физическую нагрузку с целью выделения группы риска по формированию артериальной гипертензии.
3. Использовать полученные данные (гипертонический тип реакции, высокий уровень ЭТ-1, генотип C/C полиморфизма -786T>C гена NOS3) для проведения индивидуализированных мероприятий по профилактике развития сердечно-сосудистых заболеваний.
4. В ходе спортивного отбора учитывать меньшую вероятность достижения высоких спортивных результатов у спортсменов, имеющих генотип -786C/C гена NOS3.

## Список литературы

1. Афанасьев С.А., Муслимова Э.Ф. и др. Ассоциация полиморфизмов I/D и T-786C генов ACE и NOS3 с особенностями течения ишемической болезни сердца на фоне сахарного диабета 2-го типа // Кардиология. - 2016. - Том 56 (9). - С. 5-10.
2. Бебякова Н.А., Фадеева Н.А., Хромова А.В. Влияние полиморфизма -786T>C гена eNOS на параметры гемодинамики у девушек // Журн. мед.-биол. исследований. - 2018. - Т. 6, № 3. - С. 205–213.
3. Бебякова Н. А., Феликсова О. М., Хромова А. В., Шабалина И. А. Роль полиморфизма -786T>C гена эндотелиальной NO-синтазы в формировании факторов риска развития артериальной гипертензии // Экология человека. - 2018. - № 4. - С. 36–42.
4. Бебякова Н.А., Хромова А.В., Феликсова О.М. Взаимосвязь периферической вазоконстрикции с полиморфизмом T-786C гена эндотелиальной синтазы оксида азота // Фундаментальные исследования. - 2013. - №12, ч.2. - С. 176-179.
5. Гречкина Л.И. Донозологическая характеристика показателей гемодинамики у мальчиков-уроженцев города Магадана с разным типом саморегуляции кровообращения // Здоровье населения и среда обитания. - 2016. - №1 (274). – С. 22-26.
6. Грибкова И.В., Шуберт Р., Серебряков В.П. NO активирует Ca<sup>2+</sup> - активируемый K<sup>+</sup> ток гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы через GMP - зависимый механизм // Кардиология. - 2002. - №8. - С. 34-37.
7. Давыдов В.Ю., Шамардин А.И. Методика проведения общероссийского мониторинга физического развития и физической подготовленности учащихся общеобразовательных школ, ссузов, вузов: Учебно-методическое пособие // ВГАФК - Волгоград: Изд-во ВолГУ - 2004 - 92 с.

8. Денисов Е.Н., Маслова Н.В. Вазорегулирующая функция эндотелия при гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности // Кардиология. - 2005. - №6. - С. 28–31.
9. Дроздовская С.Б., Бобровник В.И., Криворученко Е.В., Ильин В.Н. Полиморфизмы генов, способствующие высокой физической работоспособности в скоростно-силовых видах легкой атлетики // Слобожанский научно-спортивный вестник. - 2013. - № 2 (35). - С. 49-54.
10. Иманбекова М.К., Жолдыбаева Е.В., Есентаев Т.К., и др. Спорт и генетика // Биотехнология. Теория и практика. - 2013. - №2. - С. 4-11.
11. Комзин К.В. Полиморфизмы генов, вовлеченных в регуляцию артериального давления у различных этнических групп жителей Крайнего Севера Якутии, страдающих артериальной гипертензией // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки. - 2019. - №4 (17). - С. 5-12.
12. Куба А.А., Никонова Ю.М., Феликсова О.М., Хромова А.В., Бебякова Н.А. Ассоциация генетического полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота с сердечно-сосудистой патологией // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - № 3. - С. 19.
13. Линде Е.В., Орджоникидзе З.Г. Роль «спортивных полиморфизмов» в генезе стресс-индуцированной трансформации «спортивного сердца» // Лечебная физкультура и спортивная медицина. - 2011. - № 11 (95). - С. 11-17.
14. Мельник С.Н. Особенности показателей сердечно-сосудистой системы студентов с различными типами саморегуляции кровообращения // Проблемы здоровья и экологии. - 2019. - № 2 (60). - С. 80-85.
15. Недоспасов А.А., Беда Н.В. Биогенные оксиды азота // Природа. - 2005. - №7. - С. 35- 42.
16. Пономарева О.В. Генетика в современном спорте: научные технологии для новых достижений // Наука молодых (Eruditio Juvenium). - 2018. - Т. 6, №4. - С. 569-581.



17. Семенова Е.А., Валеева Е.В., Булыгина Е.А., Губайдуллина С.И., Ахметов И.И. Применение омиксных технологий в системе спортивной подготовки // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2017. - Т. 159, кн. 2. - С. 232–247.

18. Семенов М.М., Кобелькова И.В., Сорокина Е.Ю., Выборная К.В., Барышев М.А., Никитюк Д.Б. Спортивная антропогенетика - лимитирующие факторы спортивной успешности (обзор литературы) // Вестник спортивной науки. - 2019. - № 2. - С. 50-55.

19. Сиверина А.В., Скородумова Е.А., Костенко В.А., и др. Связь клинической картины инфаркта миокарда, ассоциированного с кардиоренальным синдромом, с полиморфизмом гена NOS3 и системной воспалительной реакцией // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. - 2018. - Т. 10, № 4. - С. 15-22.

20. Сметник В.П., Сметник А.А. Женские половые гормоны и сердечно-сосудистая система // Мед. совет. - 2011. - № 3-4. - С. 40-45.

21. Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р., Имаева Э.Б., Мирсаева Г.Х., Мустафина О.Е. Полиморфизм генов системы эндотелина-1 и риск эссенциальной гипертензии // Медицинская генетика. - 2015. - № 10. - С. 29-35.

22. Шляхто Е.В., Конради А.О., Моисеева О.М. Молекулярно-генетические и клеточные аспекты ремоделирования сердца и сосудов при гипертонической болезни (обзор) // Терапевтический архив. - 2004. - Т. 4 (6). - С. 22-29.

23. Ярышева В.Б., Шибкова Д.З. Генетические предикторы адаптации сердечно-сосудистой системы подростков к физическим нагрузкам // Казанский медицинский журнал. - 2017. - Т. 98, № 1. - С. 63-66.

24. Drozdovska S. Асоціація поліморфізмів генів ангіотензинконвертуючого ферменту, ендотеліальної по-синтази та А-рецептора, що активується проліфераторами пероксисом, з показниками адаптаційних реакцій кардіореспіраторної системи спортсменів до фізичних

навантажень // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology. - 2014. - № 3. - P. 71-75.

25. Drozdovska S. Комплексний аналіз поліморфізмів генів, що сприяють фізичній працездатності спортсменів у веслуванні академічному // Теорія і методика фізичного виховання і спорту. - 2013. - № 1. - P. 91-95.

26. Drozdovska S. Поліморфізми генів, що сприяють високій спортивній працездатності лижників-гонщиків // Теорія і методика фізичного виховання і спорту. - 2012. - № 3. - P. 83-87.

27. Augeri A.L., Tsongalis G.J. et al. The endothelial nitric oxide synthase -786 T>C polymorphism and the exercise-induced blood pressure and nitric oxide responses among men with elevated blood pressure // Atherosclerosis. - 2009. - Vol. 204 (2). - P. 28-34.

28. Bohm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease // Cardiovasc Res. - 2007. - Vol. 76 (1). - P. 8-18.

29. Brankovic A, Brajuskovic G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population // Int J Exp Pathol. - 2013. - Vol. 94 (6). - P. 355-361.

30. Bunjevacki V., Maksimovic N. et al. Polymorphisms of the eNOS gene are associated with disease activity in rheumatoid arthritis // Rheumatol Int. - 2016. - Vol. 36 (4). - P. 597-602.

31. Casas J.P., Cavalleri G.L., Bautista L.E. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review // Amer. J. Hum. Gen. Epidemiol. - 2006. - Vol. 17. - P. 1-15.

32. Deanfield J.E. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance // Circulation. - 2007. - Vol. 115. - P. 1285-1295.

33. Diler S.B., Oden A. The T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Prostate Cancer Cases // Genetika. - 2016. - Vol. 52 (2). - P. 249-254.

34. Doshi A.A., Ziolo M.T. et al. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium // *J Card Fail.* - 2010. - Vol. 16 (4). - P. 314-319.
35. Drozdovska S.B., Lysenko O.M. et al. T-786C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase promoter gene (eNOS) and exercise performance in sport // *Fiziol Zh.* - 2013. - Vol. 59 (6). - P. 63-71.
36. Effect of physical activity and T-786C polymorphism in blood pressure and blood flow in the elderly // *Arq. Bras. Cardiol.* - 2010. - Vol. 95, № 4. - P. 510-516.
37. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis // *Biol. Reprod.* - 2015. - Vol. 92, № 2. - P. 38-46.
38. Eynon N et al. The C allele in NOS3 -786 T/C polymorphism is associated with elite soccer player's status // *Int J Sports Med.* - 2012. - Vol. 33(7). - P. 521-524.
39. Ferdinand S., Connes P., Brudey L. et al. Impact of eNOS polymorphisms on red blood cell aggregation in sickle cell disease // *Blood Cells Mol Dis.* - 2014. - Vol.55 (2). - P. 151-153.
40. 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.
41. Gomez-Gallego F., Ruiz J.R., Buxens A. et al. The -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports // *Eur J Appl Physiol.* - 2009. - Vol. 107 - P. 565–569.
42. Gu Z. Promoter polymorphism T-786C, 894G→T at exon 7 of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with risk of osteoporosis in Sichuan region male residents // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* - 2015. - Vol. 8, № 11. - P. 15270-15274.
43. Jang M.J., Jeon Y.J. et al. Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population // *Gene.* - 2013. - Vol. 512 (2). - P. 275-281.

44. Kamberi B., Kamberi F. et al. Vascular Genetic Variants and Ischemic Stroke Susceptibility in Albanians from the Republic of Macedonia // Open Access Maced J Med Sci. - 2016. - Vol. 4 (4). - P. 556-564.
45. Kong X.Z., Zhang Z.Y. et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T-786C Polymorphism Increases Myocardial Infarction Risk: A Meta-Analysis // Med Sci Monit. - 2017. - Vol. 23. - P. 759-766.
46. Krishnaveni D., Amar Chand B. Association of endothelial nitric oxide synthase gene T-786C promoter polymorphism with gastric cancer // World J Gastrointest Oncol. - 2015. - Vol. 7. - P. 87-94.
47. Kumar A., Misra S. et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis // Neurol India. - 2017. - Vol. 65 (1). - P. 22-34.
48. Lemarié C.A., Schiffrin E.L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease // J. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. - 2010. - Vol. 11. - P. 19-31.
49. Liu D., Jiang Z. et al. Association between the - 786T>C polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis // Gene. - 2014. - Vol. 545 (1). - P. 175-183.
50. Machado-Silva W., Alfinito-Kreis R. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes modulate peripheral vasodilatory properties after myocardial infarction // Gene. - 2015. - Vol. 568 (2). - P. 165-169.
51. Malakhova S.N. Clinical aspects of endothelial no-synthase gene polymorphism in professional sportsmen // Патологія. - 2016. - Vol. 2 (37). - P. 98-104.
52. Miyaki T., Tohyama S. et al. Salt intake affects the relation between hypertension and the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene // Am J Hypertens. - 2005. - Vol. 18 (12). - P. 1556-1562.
53. Mokretar K., Velinov H. et al. Association of Polymorphisms in Endothelial Nitric Oxide Synthesis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System with

Developing of Coronary Artery Disease in Bulgarian Patients // *Genet Test Mol Biomarkers.* - 2016. - Vol. 20 (2). - P. 67-73.

54. Murtagh CF, Brownlee TE, Rienzi E, et al. The genetic profile of elite youth soccer players and its association with power and speed depends on maturity status // *PLOS ONE.* - 2020. - Vol. 15 (6). - P. 0234458.

55. Nakayama M., Yoshimura M. et al. Synergistic interaction of T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm // *Pharmacogenetics.* - 2003. - Vol. 13 (11). - P. 683-688.

56. Polat F., Turaclar N. et al. eNOS gene polymorphisms in paraffin-embedded tissues of prostate cancer patients // *Turk J Med Sci.* - 2016. - Vol. 46 (3). - P. 673-679.

57. Ragia G., Nikolaidis E. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms -786T > C and 894G > T in coronary artery bypass graft surgery patients // *Hum Genomics.* - 2010. - Vol. 4 (6). - P. 375-383.

58. Silva P.S., Fontana V. et al. eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril // *Eur J Clin Pharmacol.* - 2013. - Vol. 69 (2). - P. 167-177.

59. Wei L.K., Au A. et al. Clinical Relevance of MTHFR, eNOS, ACE, and ApoE Gene Polymorphisms and Serum Vitamin Profile among Malay Patients with Ischemic Stroke // *J Stroke Cerebrovasc Dis.* - 2015. - Vol. 24 (9). - P. 2017-2025.

60. Wentao X., Yiyang L. association between gene polymorphisms on chromosome 7 and the risk of ischemic stroke: a meta-analysis // *Int J Clin Exp Med.* - 2016. - Vol. 9 (6). - P. 8959-8970.

61. Weyerstra B, Jan et al. Nine genetic polymorphisms associated with power athlete status - A Meta-Analysis // *J Sci Med Sport.* - 2018. - Vol. 21 (2). - P. 213-220.

62. Xie X., Shi X. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene single nucleotide polymorphisms and the risk of hypertension: A meta-analysis involving 63,258 subjects // *Clin Exp Hypertens.* - 2017. - Vol. 39 (2). - P. 175-182.

63. Yildirim O., Yigit A., et al. The role of the eNOS G894T and T-786C gene polymorphism in the development of ascites in cirrhosis // Eur Rev Med Pharmacol Sci. - 2016. - Vol. 20 (22). - P. 4725-4730.

64. Yousry S.M., Ellithy H.N., Shahin G.H. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease // Hematology. - 2016. - Vol. 21 (6). - P. 359-367.

65. Zhang L., Chen L.M. et al. The G894t, T-786c and 4b/a polymorphisms in Enos gene and cancer risk: a meta-analysis // J Evid Based Med. - 2014. - Vol. 7 (4). - P. 263-269.

66. Zmijewski P, Cieszczyk P, Ahmetov II, et al. The NOS3 G894T (rs1799983) and -786T/C (rs2070744) polymorphisms are associated with elite swimmer status // Biol Sport. - 2018. - Vol. 35 (4). - P. 313-319.

Таблица 12 - Сравнение уровней вазоактивных факторов и отношения NO/ЭТ-1 у лиц контрольной группы среди генотипов полиморфизма -786T>C гена NOS3 в зависимости от типа реакции ССС на дозированную физическую нагрузку

-786T>C	Тип реакции ССС на нагрузку	Me	Q1	Q3	p
NO (мкмоль/л)					
T/T	Нормотонический	21,933	17,339	25,929	0,688
	Гипертонический	20,400	17,541	24,114	
T/C	Нормотонический	20,951	16,226	24,317	0,666
	Гипертонический	21,267	18,189	24,400	
C/C	Нормотонический	22,433	17,420	28,467	0,702
	Гипертонический	22,173	19,610	24,029	
ЭТ-1 (фмоль/мл)					
T/T	Нормотонический	0,420	0,255	0,711	0,218
	Гипертонический	0,483	0,303	0,969	
T/C	Нормотонический	0,410	0,253	0,728	0,160
	Гипертонический	0,653	0,305	1,196	
C/C	Нормотонический	0,730	0,350	1,975	0,339
	Гипертонический	0,919	0,494	1,660	
АТ II (пг/мл)					
T/T	Нормотонический	61,950	56,050	67,925	<b>0,013</b>
	Гипертонический	68,200	63,500	77,800	
T/C	Нормотонический	66,900	56,500	75,700	0,309
	Гипертонический	70,850	64,625	82,225	
C/C	Нормотонический	73,800	67,500	75,300	0,932
	Гипертонический	73,600	53,725	81,300	
Отношение NO/ЭТ-1					

Т/Т	Нормотонический	56,609	32,999	110,190	0,070
	Гипертонический	36,517	14,070	59,719	
Т/С	Нормотонический	65,906	32,814	86,257	0,241
	Гипертонический	41,351	15,190	81,880	
С/С	Нормотонический	26,319	11,516	95,367	1,000
	Гипертонический	24,442	16,787	58,319	

Примечание: полужирным шрифтом отмечены статистически значимые различия при попарном сравнении групп с расчетом критерия Манна-Уитни.



Таблица 13 - Уровень вазоактивных факторов в плазме крови лиц контрольной группы и профессиональных спортсменов

-786T>C	Исследуемая группа	Me	Q1	Q3	p
NO (мкмоль/л)					
T/T	Контрольная группа	21,797	17,339	25,656	0,088
	Спортсмены	24,645	18,495	27,350	
T/C	Контрольная группа	20,968	16,369	24,267	<b>0,026</b>
	Спортсмены	25,203	19,343	26,161	
C/C	Контрольная группа	22,433	18,435	25,167	0,257
	Спортсмены	25,878	20,208	27,559	
ЭТ-1 (фмоль/мл)					
T/T	Контрольная группа	0,431	0,265	0,800	0,171
	Спортсмены	0,388	0,328	0,468	
T/C	Контрольная группа	0,437	0,256	0,992	0,555
	Спортсмены	0,389	0,334	0,491	
C/C	Контрольная группа	0,872	0,441	1,878	<b>0,007</b>
	Спортсмены	0,433	0,324	0,504	
АТ II (пг/мл)					
T/T	Контрольная группа	65,000	59,100	73,400	0,111
	Спортсмены	58,500	57,500	65,000	
T/C	Контрольная группа	67,200	58,500	76,850	0,241
	Спортсмены	61,000	57,500	68,750	
C/C	Контрольная группа	73,800	65,900	78,600	0,498
	Спортсмены	62,500	62,500	72,500	
Отношение NO/ЭТ-1					
T/T	Контрольная группа	49,831	23,295	106,913	0,404

	Спортсмены	62,117	42,514	83,562	
Т/С	Контрольная группа	59,137	21,832	85,654	0,927
	Спортсмены	61,396	48,904	74,595	
С/С	Контрольная группа	24,622	14,236	65,256	0,301
	Спортсмены	55,743	49,164	67,782	

Примечание: полужирным шрифтом отмечены статистически значимые различия при попарном сравнении групп с расчетом критерия Манна-Уитни.

**Расчет себестоимости проведенного исследования**

Таблица 14 – Расчет себестоимости одного анализа типирования полиморфизма -786T>C гена NOS3

Статья затрат	Цена одного набора (упаковки), руб.	Кол-во наборов (упаковок) на 297 человек, шт.	Кол-во на один анализ, шт.	Стоимость для одного анализа, руб.
Пробирки с ЭДТА К3, 13x100 мм, 6 мл, пластик, 100 шт/уп	1750,00	3	1	17,50
Игла двусторонняя стандартная для вакуумных пробирок, 100 шт/уп	1520,00	3	1	15,20
Переходник многоразовый для вакуумных пробирок, 50 шт/уп	650,00	1	1	13,00
Латексные диагностические перчатки размер М, 100 пар/уп	790,00	9	3	23,70
Маска медицинская 3-х слойная одноразовая, 50	250,00	1	3	15,00

шт/уп				
Шапочка "Шарлотта" нетканая, 100 шт/уп	300,00	1	1	3,00
Салфетки медицинские проспиртованные, 100 шт/уп	250,00	3	1	2,50
Набор реагентов для выделения ДНК из ядер лейкоцитов «ДНК- экспресс-кровь-плюс», 1 флакон (60 мл), 100 выделений, Литех, Россия	2150,00	3	-	21,50
Набор реагентов для выявления полиморфизмов в генах «SNP-экспресс- кардиогенетика», формат «в реальном времени», 100 реакций, полиморфизм T-786C в гене NOS3, Россия	9300,00	3	-	93,00
Наконечники для дозатора, 10 мкл, с фильтром, Китай, 1000 шт/уп	5800,00	2	4	23,20
Наконечники для дозатора, 200 мкл, с фильтром, Китай, 1000 шт/уп	5800,00	2	5	29,00

Наконечники для дозатора, 1000 мкл, с фильтром, Китай, 1000 шт/уп	6200,00	1	2	12,40
Микроцентрифужные пробирки, 0,2 мл, Китай, 1000 шт/уп	3500,00	1	1	3,50
Микроцентрифужные градуированные пробирки, 1,5 мл, Мексика, 500 шт/уп	772,00	2	2	3,08
<b>Итоговая стоимость 1 анализа, руб.</b>				275,58

Таблица 15 – Расчет себестоимости одного анализа определения эндотелина 1 в плазме крови

Статья затрат	Цена одного набора (упаковки), руб.	Кол-во наборов (упаковок) на 297 человек, шт.	Кол-во на один анализ, шт.	Стоимость для одного анализа, руб.
Пробирки с ЭДТА К3, 13x100 мм, 6 мл, пластик, 100 шт/уп	1750,00	3	1	17,50
Игла двусторонняя стандартная для вакуумных пробирок, 100 шт/уп	1520,00	3	1	15,20

Переходник многоразовый для вакуумных пробирок, 50 шт/уп	650,00	1	1	13,00
Латексные диагностические перчатки размер М, 100 пар/уп	790,00	3	2	15,80
Маска медицинская 3-х слойная одноразовая, 50 шт/уп	250,00	1	2	10,00
Шапочка "Шарлотта" нетканая, 100 шт/уп	300,00	1	1	3,00
Салфетки медицинские проспиртованные, 100 шт/уп	250,00	3	1	2,50
Микроцентрифужные градуированные пробирки, 1,5 мл, Мексика, 500 шт/уп	772,00	1	1	1,54
Наконечники универсальные, 200 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	856,00	2	5	4,28
Наконечники универсальные, 1000 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	920,00	1	2	1,84
Набор реагентов для	82168,02	4	-	933,73

определения эндотелина 1-21 «Quantikine ELISA Endothelin-1 Immunoassay» группы «ВСМ Биохиммак», 88 определений				
<b>Итоговая стоимость 1 анализа, руб.</b>				1018,39

Таблица 16 – Расчет себестоимости одного анализа определения оксида азота в плазме крови

Статья затрат	Цена одного набора (упаковки), руб.	Кол-во наборов (упаковок) на 297 человек, шт.	Кол-во на один анализ, шт.	Стоимость для одного анализа, руб.
Пробирки с ЭДТА КЗ, 13х100 мм, 6 мл, пластик, 100 шт/уп	1750,00	3	1	17,50
Игла двусторонняя стандартная для вакуумных пробирок, 100 шт/уп	1520,00	3	1	15,20
Переходник многоразовый для вакуумных пробирок, 50 шт/уп	650,00	1	1	13,00
Латексные диагностические	790,00	3	2	15,80

перчатки размер М, 100 пар/уп				
Маска медицинская 3-х слойная одноразовая, 50 шт/уп	250,00	1	2	10,00
Шапочка "Шарлотта" нетканая, 100 шт/уп	300,00	1	1	3,00
Салфетки медицинские проспиртованные, 100 шт/уп	250,00	3	1	2,50
Микроцентрифужные градуированные пробирки, 1,5 мл, Мексика, 500 шт/уп	772,00	1	1	1,54
Наконечники универсальные, 200 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	856,00	3	8	6,85
Наконечники универсальные, 1000 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	920,00	2	5	4,60
Набор реагентов для определения окиси азота «Total NO / Nitrite / Nitrate Assay» группы «ВСМ Биохиммак», 88 определений	51180,96	4	-	581,60
Пробирка с фильтром	50283,06	3	1	502,83



Amicon Ultra 0,5 мл 10К 96РК для определения окси азота, 100 шт/уп				
<b>Итоговая стоимость 1 анализа, руб.</b>				1174,42

Таблица 17 – Расчет себестоимости одного анализа определения ангиотензина II в плазме крови

Статья затрат	Цена одного набора (упаковки), руб.	Кол-во наборов (упаковок) на 297 человек, шт.	Кол-во на один анализ, шт.	Стоимость для одного анализа, руб.
Пробирки с ЭДТА КЗ, 13x100 мм, 6 мл, пластик, 100 шт/уп	1750,00	3	1	17,50
Игла двусторонняя стандартная для вакуумных пробирок, 100 шт/уп	1520,00	3	1	15,20
Переходник многоразовый для вакуумных пробирок, 50 шт/уп	650,00	1	1	13,00
Латексные диагностические перчатки размер М, 100 пар/уп	790,00	3	2	15,80

Маска медицинская 3-х слойная одноразовая, 50 шт/уп	250,00	1	2	10,00
Шапочка "Шарлотта" нетканая, 100 шт/уп	300,00	1	1	3,00
Салфетки медицинские проспиртованные, 100 шт/уп	250,00	3	1	2,50
Микроцентрифужные градуированные пробирки, 1,5 мл, Мексика, 500 шт/уп	772,00	1	1	1,54
Наконечники универсальные, 200 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	856,00	2	5	4,28
Наконечники универсальные, 1000 мкл, Ахуген, США, 1000 шт/уп	920,00	1	1	0,92
Набор реагентов для определения ангиотензина II «Assay Max Human Angiotensin II ELISA Kit» группы «ВСМ Биохиммак», 88 определений	44538,51	4	-	506,12
<b>Итоговая стоимость 1 анализа, руб.</b>				<b>589,86</b>

Себестоимость всех проведенных анализов для 297 человек: 908300,25 рублей.