Современные маркеры в диагностике атеросклероза

Д.И. ЧЕРЕПАХИН[1], к.м.н. В.В. БАЗЫЛЕВ[2], И.А. ЕВТЮШКИН[2], д.м.н., проф. С.В. СУЧКОВ[1], к.м.н. О.М. БОГОПОЛЬСКАЯ[3], д.м.н. Э.Р. ЧАРЧЯН[3], акад. РАМН Ю.В. БЕЛОВ[3], акад. РАН И РАМН М.А. ПАЛЬЦЕВ[4]

Modern markers in diagnostics of atherosclerosis

D.I. CHEREPAKHIN, V.V. BAZILEV, I.A. EVTYUSHKIN, S.V. SUCHKOV, O.M. BOGOPOL'SKAYA, E.R. CHARCHYAN, YU.V. BELOV, M.A. PAL'TSEV

[1]Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва; [2]ФЦССХ, Пенза; [3]ФГБУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского РАМН, Москва; [4]НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Ключевые слова: атеросклероз, биологические маркеры, прогноз, профилактика, диагностика.

Key words: atherosclerosis, biological markers, prognosis, prophylaxis, diagnostics.

Объектом наиболее пристального внимания исследователей, проводящих работы по изучению сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), является атеросклероз. Наличие атеросклероза тесно ассоциируется со многими хроническими заболеваниями, в первую очередь с ишемической болезнью сердца (ИБС), которая служит основной причиной летальности.

Атеросклероз характеризуется несколькими этапами развития, причем на каждом из этапов формируются типовые биомолекулы, принадлежащие к различным семействам и отражающие специфику исследуемой патологии. Такие биомолекулы представляют собой ранние маркеры заболевания и являются возможным этиологическим фактором.

Между тем атеросклероз является многофакторным заболеванием, развивающимся на основе тесного взаимодействия фенотипа больного и факторов окружающей среды. По современным представлениям, в основе возникновения атеросклероза лежит взаимодействие многих патогенетических факторов, ведущих к образованию фиброзной бляшки (неосложненной и осложненной). Описан ряд значимых факторов, способствующих развитию заболевания, к которым отнесены следующие: а) курение; б) гиперлипопротеинемия; в) артериальная гипертензия (АГ); г) сахарный диабет; д) ожирение; е) вирусная и хламидийная инфекция, сопровождающаяся развитием хронического воспалительного процесса в стенке артерии, и др. [4]. Патологические процессы, развивающиеся в сосудистой стенке и характерные в дальнейшем для картины атеросклероза, протекают последовательно в течение длительного времени, отражая процесс на каждой из стадий заболевания. Исходом доклинической стадии является поражение определенных артериальных бассейнов. Так, поражение коронарных артерий приводит к коронарной недостаточности, проявляющейся ИБС. Поражение церебральных и сонных артерий вызывает либо преходящую ишемию мозга, либо инсульты. Поражение артерий конечностей служит причиной перемежающейся хромоты и гангрены. Поэтому очевидно, что своевременная диагностика заболевания на ранних стадиях позволит не только избежать развития осложнений, но и сохранит жизнь пациентам и их трудоспособность, а также оптимизирует расходы на лечение и реабилитацию.

1. Особенности процессов в ходе развития заболевания по стадиям

1.1. Нарушение углеводного и липидного обмена

Одной из важных составляющих механизмов нарушений углеводного обмена является проинсулин — прогормон, производимый β-клетками островков Лангерганса. Проинсулин лишен инсулиновой активности, причем период его полураспада значительно длиннее, чем у инсулина. Поэтому динамика сдвигов в концентрациях проинсулина не столь заметна, как аналогичная динамика показателей инсулина.

Проинсулин способен стимулировать адипогенез, повышать инсулинорезистентность, блокировать фибринолиз, а также служить причиной развития АГ. Уровень интактного проинсулина в плазме крови выше 11 пмоль/л свидетельствует о дисфункции β-клеток и повышенном риске развития ССЗ. Увеличенные уровни проинсулина и дез-31,32-проинсулина (продукта распада проинсулина) однозначно связывают с повышенным риском развития артериосклероза и ИБС [16].

In vitro проинсулин увеличивает продукцию ингибитора 1-го типа активатора плазминогена, который как основной ингибитор фибринолиза может играть важную роль в патогенезе атеросклероза, особенно на доклинических стадиях развития заболевания [15].

1.2. Липопротеины

Белковые компоненты липопротеинов (аполипопротеины, Апо) специфически связываются с липидами при формировании липопротеина, а также служат лигандами для специфичного распознавания липопротеинов мембранными рецепторами, являясь партнерами для ферментов, которые участвуют в метаболизме и обмене липидов [4].

Аполипопротеин А1 (АпоА1). Основной белок в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), снижение уровня которого угрожает риском возникновения атеросклероза, поражением коронарных и церебральных артерий. АпоА1 важен для поддержания структуры ЛПВП, облегчающей растворимость и

© Коллектив авторов, 2012

Kardiol serdečno-sosud hir 2012; 3: 26

e-mail: dimadimacher@gmail.com

транспорт липидов. Важнейшая его функция — активация лецитинхолестеролацилтрансферазы, с помощью которой удаляется свободный холестерин (ХС) из внепеченочных тканей, в том числе из стенки сосудов [4, 7]. Таким образом, АпоА1 участвует в механизмах антиатерогенного действия ЛПВП, препятствующих отложению ХС в атеросклеротических бляшках (АСБ) сосудов. Определение АпоА1 важно для оценки антиатерогенной активности крови и риска развития ССЗ [21].

Аполипопротеин В (АпоВ). Основной компонент всех липопротеинов, кроме ЛПВП, отражающий опасность развития атеросклероза. Синтез АпоВ и его включение в хиломикроны и липопротеины очень низкой плотности важны для формирования итоговых частиц и поступления их в кровоток, что повышает растворимость и транспорт ХС, ведущий к его отложению в стенках артерий.

Кроме того, АпоВ играет существенную роль в механизмах распознавания и связывания липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) специфическими рецепторами клеточных мембран, которые имеются практически на всех клетках организма, за исключением клеток нервной системы и эритроцитов.

По данным многих исследований, риск развития атеросклероза обусловлен количеством циркулирующих атерогенных частиц, которые связываются со стенками сосудов и проникают в эндотелий. Наиболее точно количество таких циркулирующих частиц отражают концентрации АпоВ и АпоА. Поэтому АпоВ — самый точный индикатор риска развития ССЗ; соотношения АпоВ/АпоА по своей точности в оценке коронарных рисков у пациентов с бессимптомным течением ССЗ и у лиц, страдающих сахарным диабетом, превосходят прогностические свойства всех других соотношений ХС.

2. Окислительный стресс и дисфункция эндотелия

Функциональное состояние эндотелиальной клетки отражает характер и интенсивность формирования вазоактивных веществ, входящих в структуру межклеточного матрикса, и секреции факторов клеточного роста, важных для поддержания стабильности стенки сосудов.

Состояния эндотелиальной клетки, инициирующие риск развития атеросклероза, в основном обусловлены реакцией эндотелиоцита на взаимодействие с атерогенными ЛПНП. Одной из причин окислительного стресса является нарушение баланса окислителей и антиоксидантов. Количественное определение антиоксидантов — важный инструмент оценки антиоксидантной защиты и/или эффекта окислительного стресса [19].

2.1. Миелопероксидаза

Миелопероксидаза — фермент, экспрессируемый всеми клетками миелоидного ряда, продукт активированных лейкоцитов. За счет окислительного потенциала образующийся гипохлорит-ион способен уничтожать патогенные микроорганизмы. Однако поскольку действие гипохлорит-иона неспецифично, он может повреждать сосудистый эндотелий и модифицировать компоненты ЛПНП и ЛПВП, при этом изменяя физико-химические свойства поверхности липопротеинов таким образом, что они образуют ассоциаты [12]. Часть слипшихся липопротеинов оседает в сосудистой стенке, а другую часть поглощают клетки артериальной оболочки, которые при этом превращаются в «пенистые» клетки — предшественники атеросклеротических бляшек. Высокие уровни миелопероксидазы связаны с развитием дисфункции эндотелия [7].

2.2. Гомоцистеин

Гомоцистеин — серосодержащая аминокислота, являющаяся продуктом переработки незаменимой аминокислоты метионина [22].

Гомоцистеин повреждает стенки сосудов, делая их поверхность рыхлой. На поврежденную поверхность осаждаются ХС и кальций, образуя АСБ. Накапливаясь в организме, гомоцистеин начинает атаковать внутреннюю стенку артерий — интиму, в которой образуются разрывы эндотелия, и на поврежденную поверхность которых осаждаются ХС и кальций, образуя АСБ. Вследствие этого просвет сосуда сужается, а иногда и вообще закупоривается, что приводит либо к тромбозу, либо к разрыву сосуда со всеми последствиями (в том числе инсульт, инфаркт миокарда, эмболия). Повышение уровня гомоцистеина крови на 5 мкмоль/л (при норме менее 12,4 мкмоль/л) приводит к увеличению риска атеросклеротического поражения сосудов на 80% у женщин и на 60% у мужчин [7, 18].

Результаты клинических исследований позволили выявить связь уровня общего гомоцистеина крови с толщиной слоя интимы-медии артерии, что подтверждает предположение о значимости гипергомоцистеинемии при повреждении стенки сосуда, в том числе на ранних стадиях атеросклероза. У мужчин с уровнем гомоцистеина, всего на 12% превышающем норму, риск развития ИБС увеличен в 3 раза. Это стимулирует внедрение мониторинга концентрации гомоцистеина в широкую клиническую практику [7, 11].

2.3. Окисленные липопротеины низкой плотности

Окисление липидов — естественный метаболический процесс, необходимый для роста клеток, поэтому существуют защитные антиокислительные клеточные механизмы. Последние препятствуют превышению нормальных концентраций окисленных липопротеинов, которые играют критическую роль в развитии и прогрессировании атеросклероза.

ЛПНП являются липидами «атерогенной» фракции, поскольку в наибольшей степени подвержены перекисной модификации. Перекисно-модифицированные ЛПНП подвергаются нерегулируемому захвату макрофагами и гладкими мышечными клетками (ГМК) артериальной стенки, что приводит к массивному накоплению в них эфиров ХС и трансформации таких клеток в «пенистые». Последние быстро погибают, освобождая в межклеточные пространства интимы значительное количество эфиров холестерина и его моногидрата, что инициирует образование АСБ.

При этом перекисная модификация ЛПНП сопровождается существенным повышением их иммуногенности, а образование антител к окисленным ЛПНП, которые захватываются клетками артериальной стенки, служит дополнительным индикатором повреждения. Кроме того, окисленная форма липопротеинов обладает повышенным сродством к β_2-гликопротеину-1, образуя комплекс, который является маркером риска развития атерогенеза при аутоиммунных заболеваниях [10].

2.4. 8-Изопростан

Это вещество относят к семейству эйкозаноидов, образование которых происходит при неферментативном окислении фосфолипидов клеточных мембран. Являясь продуктом метаболизма арахидоновой кислоты, 8-изопростан может служить надежным маркером уровня оксидантного стресса в организме. Повышенное содержание 8-изопростана в сыворотке крови свидетельствует, что развитие и прогрессирование этого заболевания сопровождается оксидантным стрессом и накоплением в организме продуктов свободнорадикального окисления биологических мембран [13, 20].

2.5. Оксид азота

Одно из вероятных звеньев повреждения эндотелиоцитов сосудистой стенки — нарушение синтеза оксида азота (NO), занимающее ведущее место в патогенезе дисфункции эндотелия и, возможно, атеросклероза [12, 17].

Роль NO как сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе была определена Ф. Фурчготт, Л. Игнарро и Ф. Мюрад, которые были удостоены премии Нобелевского комитета по физиологии и медицине в 1998 г.

Помимо влияния на сосудистый тонус, оксид азота оказывает модулирующее действие на освобождение вазоактивных медиаторов, ингибирует адгезию лейкоцитов (угнетает экспрессию VCAM-1, ICAM-1, Е-селектина, снижает стабильность мРНК моноцитарного хемотаксического фактора). Увеличение экспрессии молекул адгезии приводит к миграции воспалительных клеток в эндотелий, скоплению их в субэндотелиальном пространстве, после чего происходят захват макрофагами ХС, различных липопротеинов и формирование так называемого ядра АСБ.

NO — свободный радикал, вызывающий зависимую от свойств эндотелия вазодилатацию, а также ингибирующий активацию, секрецию, адгезию и агрегацию тромбоцитов (цГМФ-зависимый механизм), адгезию лейкоцитов к эндотелию и пролиферацию ГМК сосудистой стенки. Следовательно, снижение продукции NO в поврежденном эндотелии способствует агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов, вазоконстрикции и дальнейшему прогрессированию атеросклероза и развитию тромбоза. Таким образом, эндотелий является объединяющим звеном между метаболическими и морфологическими нарушениями в современной концепции атеротромбоза. Кроме того, сам NO представляет парамагнитную молекулу, т.е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать так называемый нитрозилирующий стресс.

Уровень активного оксида азота в области атеросклеротических бляшек снижается из-за воздействия на сосудистую стенку окисленных липопротеинов, угнетая основной фермент продукции NO [11].

3. Воспаление в субэндотелиальном слое

Миграцию лейкоцитов, в основном моноцитов и лимфоцитов, обеспечивают расположенные на эндотелии рецепторы — молекулы адгезии, такие как VCAM-1 и ICAM-1 и Р-селектины. Синтез молекул адгезии усиливается в присутствии цитокинов. Так, интерлейкин-1 (ИЛ- 1) и фактор некроза опухоли (ФНО) вызывают или усиливают синтез эндотелиальными клетками VCAM-1 (молекулы, вовлекаемые в адгезию к эндотелию) и ICAM-1 (молекулы, вовлекаемые в межклеточную адгезию). В свою очередь выброс цитокинов клетками сосудистой стенки стимулируется модифицированными липопротеинами [1, 2].

У больных АГ возможным инструментом такой диагностики может стать количественное определение молекул межклеточной адгезии sICAM-1. Получены статистически значимые данные о том, что у больных АГ без метаболических нарушений повышение уровня sICAM-1 ассоциируется со снижением уровня ЛПВП, и это является маркером начального этапа развития атеросклеротического процесса у пациентов данной категории [6, 9].

3.1. Секреторная фосфолипаза A_2 типа IIA ($sPLA_2$ IIA)

PLA_2 — группа близких по действию ферментов, секреция которых происходит в ответ на выброс белков воспаления — ФНО и ИЛ-1.

Исходно $sPLA_2$ связана с циркулирующими в плазме атерогенными частицами. Такие циркулирующие комплексы проникают в интиму. Под воздействием оксидантного стресса происходит окисление всех компонентов ЛПНП и при этом образуются лизофосфатидилхолин и окисленные жирные кислоты, которые являются медиаторами воспаления за счет рекрутирования и активации моноцитов/макрофагов. Уровень циркулирующей секретированной фосфолипазы А2 служит чувствительным и достаточно высокоспецифичным индикатором активности атеросклеротического процесса и риска развития острых коронарных осложнений у лиц с ИБС [3]. Циркулирующая секретированная фосфолипаза А2 — компонент острой фазы, который экспрессируется в стенке артерий при локальном воспалении и является мощным активатором моноцитов, играя существенную роль в атерогенезе. Для диагностики атеросклероза, ишемии и ишемической реперфузии могут быть важны PLA нескольких групп (IIA, V и X) [2, 7].

Секретированная PLA_2 рассматривается как важный сердечно-сосудистый маркер, независимый от традиционных факторов риска [2]. В настоящее время рекомендуются следующие референсные уровни PLA_2: <200 нг/мл — низкий риск, 200—235 нг/мл — пограничный диапазон, >235 нг/мл — высокий риск.

3.2. Пентраксин-3 (PTX3)

Пентраксины — семейство белков с циклической пентамерной структурой и способностью связывать определенные вещества зависимым от кальция образом. Провоспалительная молекула PTX3 представляет собой белок, структурно похожий на С-реактивный белок, но продуцируется преимущественно в эндотелиальных клетках, ГМК и макрофагах, которые являются компонентами сосудистой стенки и АСБ [7].

Уровень PTX3 более эффективно отражает местное сосудистое воспаление, чем любой другой известный белок острой фазы. Доказано, что PTX3 значительно повышен у лиц с метаболическим синдромом и субклиническим атеросклерозом [19]. Повышение уровней PTX3 в плазме ассоциируется с воспалением артериальной стенки и не ассоциируется ни с какими известными факторами риска развития ССЗ.

3.3. Селектины

Р-селектин локализуется в α-гранулах и тельцах Вейбеля—Паладе эндотелиальных клеток. При воздействии стимулирующих факторов (окислительные радикалы, тромбин, цитокины) Р-селектин мгновенно устремляется к поверхности клетки. Повышенная экспрессия Р-селектина отмечается в АСБ и это позволяет предполагать роль Р-селектина в развитии атеросклероза и коронарных заболеваний сердца. Р-селектин обеспечивает быструю адгезию нейтрофилов и моноцитов к активированному сосудистому эндотелию на ранней фазе воспаления, а также лейкоцитов к активированным тромбоцитам [7].

4. Формирование «пенистых» клеток. Стабильность атеросклеротической бляшки

4.1. Матриксные металлопротеиназы (ММП)

Клиническое и прогностическое значение сформированной АСБ во многом зависит от ее структуры (фиброзной капсулы и липидного ядра). Существует несколько типов клеток, включая базофилы, нейтрофилы, ГМК и эндотелиальные клетки, которые под действием провоспалительных цитокинов секретируют ММП, однако главным источником продукции являются активизированные макрофаги [3].

Семейство ММП состоит более чем из 20 протеолитических ферментов. Все они характеризуются наличием следующих общих свойств: разрушают межклеточный матрикс, секретируются как профермент и для активации нуждаются в протеолитическом расщеплении, активны в нейтральной среде. Толщина фиброзной капсулы резко зависит от активности ММП, поскольку они способны расщеплять белки межклеточного матрикса в нейтральной среде. В наиболее уязвимой области АСБ обнаруживается наибольшая активность ММП. Из всех ММП в нормальном участке сосудистой стенки можно обнаружить только ММП-2, тогда как в АСБ определяется не менее 5 ферментов, которые экспрессируются макрофагами: ММП-1, 2, 7, 9 и 12. Показано,

что под влиянием ИЛ-1β и ФНО ГМК секретируют ММП-1 и 3. Источником образования этих цитокинов в АСБ служат макрофаги. «Пенистые» клетки сохраняют способность активно образовывать различные ММП. В наибольшей степени нестабильность АСБ определяется активностями ММП-1, 3 и 9 [5].

5. Возможный протокол ранней диагностики и мониторинга групп риска и больных атеросклерозом

Достаточно длительный период развития заболевания, когда отсутствуют клинические проявления, может дать врачу возможность воздействовать на определенные звенья атерогенеза, и соответственно остановить развитие патологии с переходом на клиническую стадию процесса.

Для более ранней диагностики необходимо использовать определенные биологические молекулы, которые одновременно могут быть и пусковым механизмом, и фактором дальнейшего развития заболевания.

Такие исследования необходимо проводить у лиц из группы риска, а также среди пациентов с предполагаемым заболеванием. К таким категориям относятся:

а) пациенты старше 40 лет;

б) ближайшие родственники пациентов, страдающих ИБС, АГ;

в) больные сахарным диабетом и ожирением и с семейным анамнезом этих заболеваний;

г) дети 12—16 лет (для ранней диагностики начальных стадий).

Каждая в отдельности биологическая молекула-маркер не дает полной картины развития заболевания. Вместе с тем обнаружение этих маркеров в едином диагностическом пакете позволяет максимально точно поставить диагноз (в том числе на доклинической стадии развития патологии) и, более того, предварительно предположить размер возможного повреждения.

Этап первичной идентификации биомаркеров следует начинать с количественного определения показателей липидного обмена, окислительного стресса и воспалительного процесса в сосудистой стенке. При положительном результате итоговых тестов (не менее 3 серопозитивных маркеров на каждый клинический случай) следует перейти ко второму этапу диагностики (функциональные и рентгенологические), который дает возможность определить локализацию повреждения и оценить его размер. Тем более что места локализации и масштабы таких повреждений заметно варьируют, несмотря на то что механизмы их формирования сходны при любых поражениях сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Визир В.А., Березин А.Е.* Иммуновоспалительная активация как концептуальная модель формирования и прогрессирования сердечной недостаточности. Тер арх 2000; 4: 77—80.
2. *Вельков В.В.* С-реактивный белок и липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2: Новые факты и новые возможности для диагностики и стратификации сердечно-сосудистых рисков. Клин-лаб консилиум 2009; 6: 28—33.
3. *Волков В.И., Калашник Д.Н., Серик С.А.* Изменение уровня матриксной металлопротеиназой-9 у больных со стабильной и нестабильной стенокардией. Украинский терапевтический журн 2006; 1: 4—7.
4. *Дати Ф., Метцман Э.,* Белки. Лабораторные тесты и клиническое применение. М: Лабора 2007; 303—312.
5. *Землянская О.А.* Роль матриксных металлопротеиназ в развитии рестенозов после чрескожных коронарных вмешательств. Ангиол и сосуд хир 2009; 1: 29—35.
6. *Косарева П.В., Лиманский А.С., Зимушкина Н.А.* Экспрессия ICAM-1, проапоптического белка FAS LIGAND и регуляторного протеина KI-67 в ткани почек экспериментальных животных при моделировании стафилококкового пиелонефрита. Современные проблемы науки и образования 2009; 6: 83—83.
7. Материалы Международной Федерации клинической химии и лабораторной медицины Инсбрук, Австрия, 7—11 июня 2009 г. Клин-лаб консилиум 2009; 5: 73—79.
8. *Назаров П.Г.* Пентраксины в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, организации матрикса, фертильности. Мед акад журн 2010; 4: 107—124.
9. *Николаев Н.А., Бунова С.С., Нелидова А.В. и др.* Межклеточные молекулы адгезии sicam-1 в диагностике доклинического атеросклероза у больных артериальной гипертонией без метаболических нарушений. Фундаментальные исследования 2008; 1: 109—110.
10. *Пигаревский П.В.* Антигены и их роль в иммуновоспалительных реакциях при атерогенезе у человека. Мед акад журн 2010; 4: 210—217.
11. *Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А.* Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов. Биохимия 1998; 7: 76—83.
12. *Cooke J.P.* Role of nitric oxide in progression and regression of atherosclerosis. West J Med 1996; 164: 419—424.
13. *Cracowski J.L., Stanke-Labesque F., Bessard G.* Isoprostanes: new markers of oxidative stress. Fundamental and clinical aspects. Rev Med Int 2000; 21: 304—307.
14. *Lentz S.R., Haynes W.G.* Homocysteine: Is it a clinically important cardiovascular risk factor? Clev Clin J Med 2004; 71: 729—734.
15. *Mykkanen L., Zaccaro D.J., Hales C.N. et al.* The relation of proinsulin and insulin to insulin sensitivity and acute insulin response in subjects with newly diagnosed type II diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Diabetologia 1999; 42: 1060—1066.
16. *Nagi D.K., Hendra T.J., Ryle A.J. et al.* The relationships of concentrations of insulin, intact proinsulin and 32—33 split proinsulin with cardiovascular risk factors in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. Diabetologia 1990; 33: 532—537.
17. *Ocmar B.S., Tschudi M.R., Godoy N. et al.* Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. Circulation 1998; 97: 2494—2498.
18. *Potter K.* Homocysteine and cardiovascular disease: should we treat? Clin Biochem Rev 2008; 29: 27—30.
19. *Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. Circulation 2003; 107: 499—511.
20. *Roberts L.J., Morrow J.D.* Measurement of F2-isoprostanesas an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med 2000; 28: 4: 505—513.
21. *Tietz W.* Clinical guide to laboratory tests. 4-th ed. Ed. Wu A.N.B. USA: W.B. Sounders Company 2006; 1798.
22. *Trabetti E.* Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. J Appl Genet 2008; 49: 267—282.

Поступила 10.02.12