

Abstract

I. V. Marchenko,
Sumy State University, 2,
Rymkogo-Korsakova st., Sumy,
Ukraine

**ANALYSIS OF COMBINED EFFECT OF THE *ENPP1* GENE
RS997509 & RS1044498 POLYMORPHISMS UPON THE RISK
OF TYPE 2 DIABETES**

Introduction. Analysis of single-nucleotide polymorphisms (SNP) of genes is one of the modern diagnostic methods, which allows revealing hereditary predisposition to multifactorial diseases, including type 2 diabetes mellitus (T2D). Considering that in most of the populations under investigation, the *ENPP1* gene polymorphic rs997509 site is in a non-equilibrium relationship with another well-studied locus rs1044498 of this gene, our studies were aimed at studying the complex effect of rs997509 and rs1044498 polymorphic sites on T2D in Ukrainian population.

Purpose. To study the complex effect of rs997509 and rs1044498 polymorphic sites of the *ENPP1* gene on T2D.

Materials and Methods. Venous blood of 317 patients with type 2 diabetes mellitus and 302 controls. All subjects were genotyped using the method of polymerase chain reaction with further analysis of restriction fragment length.

Results. In the study of the complex effect of rs997509 and rs1044498 polymorphic sites of the *ENPP1* gene on type 2 diabetes mellitus in the comparison groups, it was found that the locus of these SNPs is in strong non-equilibrium adhesion ($D'=0.970$, $r^2=0.157$). The AC haplotype was more common among healthy individuals and had statistical significance (OR = 0.698; 95% CI = 0.530-0.920; P = 0.011). Haplotype CT was significantly more common in the group of patients with type 2 diabetes than in control, and increased the risk of type 2 diabetes in 1.9-fold (95% CI = 1,045-3,44; P = 0.035 respectively). There was no difference in the frequency of the haplotype CC between the comparison groups (P = 0.128). It has been found that the coincidence of the heterozygotes and homozygotes of the minor Q-allele for SNP rs1044498 and one of any possible genotypes for SNP rs997509 is associated with a high risk of type 2 diabetes. In addition, the coincidence of homozygotes of major K-allele of the 4th exon with carriers of the minor T-allele of the polymorphic site of the 1st intron of the *ENPP1* gene leads to a significant increase in the risk of type 2 diabetes. The analysis of inter-locus interactions revealed a weak neutralizing effect (-0.79%) between the studied polymorphisms of the *ENPP1* gene (P = 0.022).

Conclusion. Predictor of an increased risk of type 2 diabetes is the combination of one of the variants of genotypes (K/K, K/Q or Q/Q) for rs1044498 with heterozygote (C/T) for rs997509; and a combination of carriers of the minor Q-allele of 4th exon with homozygote (C/C) of the 1st intron *ENPP1* gene.

Keywords: type two diabetes mellitus, Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1, allelic polymorphism.

Corresponding author: i.marchenko@med.sumdu.edu.ua

Резюме

I. В. Марченко,

Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, Україна, 40007

АНАЛІЗ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ ПОЛІМОРФІЗМІВ RS997509 ТА RS1044498 ГЕНА *ENPP1* З РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Мета роботи. Вивчити комплексний вплив rs997509 та rs1044498 поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету (ЦД) 2-го типу.

Матеріали і методи. Визначення генотипів пацієнтів здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) з венозної крові 317 пацієнтів з ЦД 2-го типу і 302 осіб контрольної групи. Статистичний аналіз здійснено за допомогою програми SPSS-17.0.

Результати. При вивченні комплексного впливу rs997509 та rs1044498 поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу у групах порівняння, виявилось, що локуси зазначених SNP перебувають у міцному нерівноважному зчепленні ($D' = 0,970$, $r^2 = 0,157$). Гаплотип AC частіше зустрічався серед здорових осіб, що мало статистичну значущість (OR = 0,698; 95 % CI = 0,530–0,920; P = 0,011). Гаплотип CT, навпаки, зустрічався достовірно частіше у групі хворих із цукровим діабетом 2-го типу, ніж у контролі, та збільшував ризик розвитку ЦД 2-го типу в 1,9 разів (95 % CI = 1,045–3,44; P = 0,035 відповідно). Різниця в частоті гаплотипу CC між групами порівняння виявлено не було (P = 0,128). Виявлено, що збіг гетерозигот і гомозигот за мінорним Q-алелем за SNP rs1044498 та одним із будь-яких можливих генотипів за SNP rs997509 асоціюється з високим ризиком розвитку цукрового діабету 2-го типу. При цьому збіг гомозигот за основним K-алелем поліморфізму 4-го екзона з носіями мінорного T-алеля поліморфного сайту 1-го інтрона гена *ENPP1* також призводить до значного збільшення ризику ЦД 2-го типу. Аналіз міжлокусних взаємодій виявив слабкий нейтралізуючий ефект (-0,79 %) між досліджуваними поліморфізмами (P = 0,022).

Висновок. Комбінація одного із варіантів генотипів (K/K, K/Q або Q/Q) за rs1044498 та гетерозигот (C/T) за rs997509, а також поєднання носіїв мінорного Q-алеля за поліморфізмом 4-го екзона з гомозиготами (C/C) за поліморфізмом 1-го інтрона гена *ENPP1* є предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, поліморфізм генів.

Резюме

I. В. Марченко,

Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, г. Суми, Україна

АНАЛІЗ КОМПЛЕКСНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ RS997509 И RS1044498 ГЕНА *ENPP1* НА РИСК РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

Цель работы. Изучить комплексное воздействие rs997509 и rs1044498 полиморфных сайтов гена *ENPP1* на риск развития сахарного диабета (СД) 2-го типа.

Материалы и методы. Определение генотипов пациентов осуществляли методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) с венозной крови 317 пациентов с СД 2-го типа и 302 лиц контрольной

групи. Статистический анализ осуществлен с помощью программы SPSS-17.0.

Результаты. При изучении комплексного воздействия rs997509 и rs1044498 полиморфных сайтов гена *ENPP1* на развитие сахарного диабета 2-го типа в группах сравнения, оказалось, что локусы указанных SNP находятся в прочном неравновесном сцеплении ($D'=0,970$, $r^2=0,157$). Гаплотип AC чаще встречался среди здоровых лиц и имел статистическую значимость (OR = 0,698; 95% CI = 0,530-0,920; P = 0,011). Гаплотип CT, наоборот, встречался достоверно чаще в группе больных с сахарным диабетом 2-го типа, чем в контроле, и увеличивал риск развития СД 2-го типа в 1,9 раз (95% CI = 1,045-3,44; P = 0,035 соответственно). Разницы в частоте гаплотипа CC между группами сравнения выявлено не было (P = 0,128). Выявлено, что совпадение гетерозигот и гомозигот по минорным Q-аллелей по SNP rs1044498 с одним из любых возможных генотипов по SNP rs997509 ассоциируется с высоким риском развития сахарного диабета 2-го типа. При этом совпадение гомозигот по основному K-аллелю полиморфизма 4-го экзона с носителями минорного T-аллеля полиморфного сайта 1-го интрона гена *ENPP1* также приводит к значительному увеличению риска СД 2-го типа. Анализ межлокусных взаимодействий обнаружил слабый нейтрализующий эффект (-0,79%) между исследуемыми полиморфизмами (P = 0,022).

Вывод. Комбинация одного из вариантов генотипов (K/K, K/Q или Q/Q) по rs1044498 и гетерозигот (C/T) по rs997509, а также сочетание носителей минорного Q-аллеля по полиморфизму 4-го экзона с гомозиготами (C/C) по полиморфизму 1-го интрона гена *ENPP1* является предиктором повышенного риска развития сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, эктонуклеотид пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1, полиморфизм генов.

Автор, відповідальний за листування: i.marchenko@med.sumdu.edu.ua

Вступ

Цукровий діабету (ЦД) 2-го типу був і залишається основною проблемою сучасної теоретичної та клінічної медицини. Кількість хворих на цю недугу у всьому світі постійного збільшується. За даними ВООЗ та Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) до 2030 року прогнозується зростання числа пацієнтів до 552 млн [1].

ЦД 2-го типу належить до групи мультифакторіальних хвороб, що зумовлене порушенням інсуліносекреції або розвитком інсулінорезистентності, внаслідок дії різноманітних ендегенних (генетичних) та екзогенних факторів, яке супроводжується порушенням усіх видів обміну речовин. Існує думка, що зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну передуює появі перших клінічних проявів в середньому на 15 років та є основною ланкою у патогенезі ЦД 2-

го типу [2]. Генетичні дефекти, що лежать в основі розвитку резистентності тканин до дії інсуліну, порушують передавання внутрішньоклітинних сигналів від рецептора інсуліну до ефекторних структур клітини [3]. Одним із генів-кандидатів ЦД 2-го типу є ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), білковий продукт якого пригнічує дію інсуліну, за рахунок впливу на тирозинкіназну активність α -субодиниці його рецептора та призводить до інсулінорезистентності [4]. Тому його поліморфізми можуть виступати в ролі генетичних маркерів для ранньої діагностики ЦД 2-го типу.

Аналіз одноступеневих поліморфізмів генів (SNP) – один із сучасних методів діагностики, що дозволяє виявити спадкову схильність до мультифакторіальних хвороб, у тому числі і до цукрового діабету 2-го типу. Враховуючи те, що в більшості досліджуваних популяцій полімор-

фний сайт rs997509 гена *ENPP1* знаходиться в нерівноважному зчепленні з іншим добре вивченим локусом rs1044498 цього гена [5; 6], а також той факт, що гаплотипний аналіз є більш ефективним в контексті пошуку генетичних предикторів, ніж аналіз однонуклеотидних поліморфізмів, наші дослідження були направлені на вивчення комплексного впливу rs997509 та rs1044498 поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в українській популяції.

Матеріали і методи. Дослідження проведено із використанням венозної крові 317 пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу (середній вік $64,9 \pm 8,2$ року) та 302 осіб, що склали контрольну групу (середній вік $65,1 \pm 14,5$). Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини в якості об'єкта дослідження» і схвалена Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед включенням в дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду на використання крові в генетичних дослідженнях.

Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лабораторія «Ізоген», Росія). Протокол виділення ДНК. 1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл нерозведеної венозної крові та додати 400 мкл лізуючого розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів; 2. Термостатування суміші 5 хв за температури 650 С; 3. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та додавання 20 мкл ретельно збовтаної на вортексі суспензії сорбенту NucleoSTM; 4. Перемішування пробірок упродовж 10 хвилин; 5. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту; 6. Додавання 200 мкл лізуючого розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану; 7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів; 8. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення су-

пернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану; 10. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу; 12. Висушування осаду при температурі 650 С протягом 5 хв.; 13. Додавання в пробірки 50 мкл ЕкстраГенуTM при постійному перемішуванні останнього розчину; 14. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії і термостатування за температури 650 С протягом 5 хв.; 15. Суспензування вмісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв.; 16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання за температури – 200 С°.

Методика визначення поліморфізму 1-го інтрона (rs997509) та поліморфізму 4-го екзона (rs1044498) гена *ENPP1* представлена в попередніх наших роботах [7; 8].

Результати та їх обговорення. При вивченні комплексного впливу rs997509 та rs1044498 поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу у групах порівняння, виявилось, що локуси зазначених SNP перебувають у міцному нерівноважному зчепленні ($D' = 0,970$, $r^2 = 0,157$). Це дозволило визначити частоту гаплотипів, що утворюють rs997509 та rs1044498 поліморфізми гена *ENPP1*, та провести аналіз їх асоціації з розвитком ЦД 2-го типу (табл. 1).

Із отриманих даних бачимо, що гаплотип СТ у групі хворих із цукровим діабетом 2-го типу зустрічався достовірно частіше, ніж у контролі, та збільшував ризик розвитку діабету в 1,9 разів (95 % CI = 1,045–3,44; $P = 0,035$). Гаплотип АС, навпаки, частіше зустрічався серед здорових осіб, що мало статистичну значущість (OR = 0,698; 95 % CI = 0,530–0,920; $P = 0,011$). Різниця в частоті гаплотипу СС між групами порівняння виявлено не було ($P = 0,128$).

Використовуючи метод скорочення багатфакторної розмірності (MDR), ми створили класифікаційну модель, що дозволяє прогнозувати ризик розвитку діабету у загальній популяції, а також діагностувати його в необстежених пацієнтів. Модель АС&СТ, що включала досліджувані SNP rs997509 та 1044498, мала прогностичну здатність 54,5 % на навчальній (Training

Таблиця 1 – Аналіз розподілу гаплотипів гена *ENPP1* у хворих з ЦД 2-го типу та осіб контрольної групи

Гаплотип	ЦД 2-го типу		Контроль		P	OR	95 % CI
	2n	частота	2n	частота			
AC	482	0,761	495	0,821	0,011	0,698	0,530-0,920
CC	116	0,183	91	0,151	0,128	1,262	0,935-1,70
CT	33	0,053	17	0,028	0,035	1,896	1,045-3,44

Примітка: n – кількість осіб; OR – відношення шансів; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Balanced Accuracy) і 53,1 % – на тестованій вибірці (Testing Balanced Accuracy) з крос-перевірною здатністю 10/10 (Crossvalidation Consistency) (рис. 1). Виявлено, що збіг гетерозигот (K/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) за SNP rs1044498 та одним із будь-яких можливих генотипів (C/C або C/T) за SNP rs997509 асоціюється з високим ризиком розвитку ЦД 2-го типу. При цьому збіг гомозигот за

основним K-алелем поліморфізму 4-го екзона з носіями мінорного T-алеля поліморфного сайту 1-го інтрона також призводить до значного збільшення ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу. Також методом MDR встановлено, що частка ентропії (найбільший незалежний ефект) щодо статусу «випадок – контроль» пов'язана з локусами CT та AC приблизно однакова і дорівнює 0,70 та 0,71 % відповідно (рис. 2).

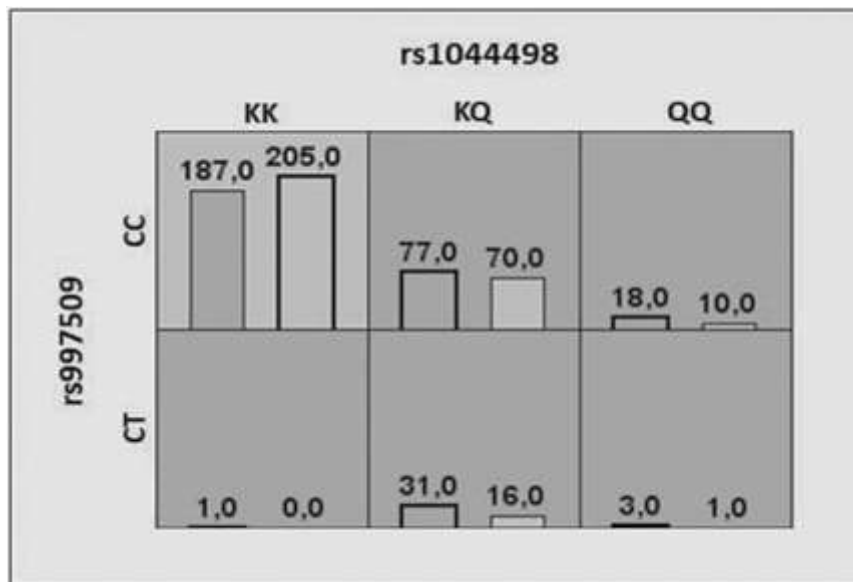


Рисунок 1 – Комбінації генотипів за поліморфізмами rs997509 та rs1044498, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ЦД 2-го типу. Лівий стовпчик у межах кожної комірки відображає кількість випадків діабету, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі комірки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ЦД 2-го типу



Рисунок 2 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу

Аналіз міжлокусних взаємодій виявив відсутність синергічного ефекту між досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1*, навпаки, між ними спостерігався слабкий нейтралізуючий ефект (-0,79 %). Застосування пермутаційних (рандомізованих) тестів виявило те, що наведена двокомпонентна модель є статистично значущою (P = 0,022).

Враховуючи той факт, що ЦД 2-го типу є мультифакторіальною патологією, ми проаналізували поєднаний вплив генетичного поліморфізму окремо з відомими факторами ризику цукрового діабету 2-го типу за допомогою методу

зменшення багатофакторної розмірності. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність на тестованій вибірці (57 %) мала трикомпонентна модель, що включала поліморфні сайти rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* та індекс маси тіла (крос-перевірна здатність – 10/10) (рис. 3). Із отриманих даних, бачимо, що ризик виникнення діабету зростає при поєднанні одного із варіантів генотипів (К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона та носіями мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона досліджуваного гена в осіб з різними величинами ІМТ.

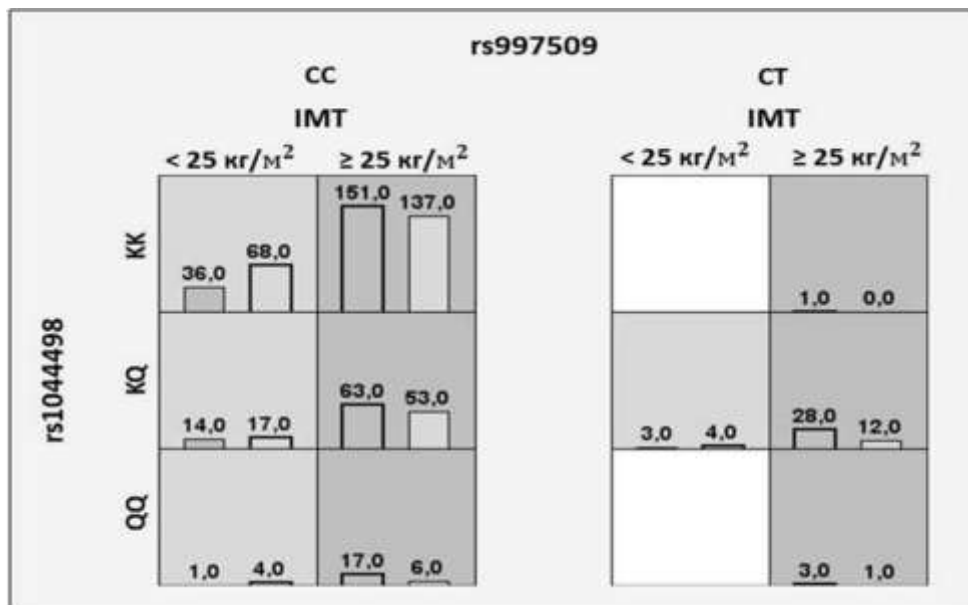


Рисунок 3 – Комбінації генотипів за rs997509 і rs1044498 поліморфізмами та індексом маси тіла (ВМІ), що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику ЦД 2-го типу. Пояснення див. на рис. 3.3.1

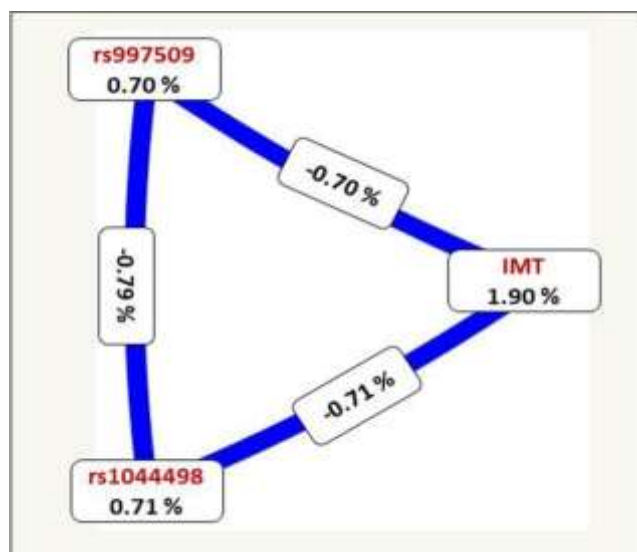


Рисунок 4 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжфакторної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу

Кластерний аналіз показав, що найбільша частка ентропії серед усіх факторів належала індексу маси тіла (1,90 %) (рис. 4). Проте, картина міжфакторної взаємодії характеризувалася нейтралізуючим ефектом між двома досліджуваними поліморфізмами (-0,79 %) та окремо між кожним з них та ІМТ (-0,70 % – для сайта rs997509; -0,71 % – для SNP rs1044498). Рандомізовані тести показали, що така трикомпонент-

Висновки

Комбінація одного із варіантів генотипів (К/К, К/Q або Q/Q) за rs1044498 та гетерозигот (С/Т) за rs997509, а також поєднання носіїв мінорного Q-алеля за поліморфізмом 4-го екзона з

Перспективи подальших досліджень

У перспективі наших досліджень є вивчення впливу інших відомих SNP (rs9375831, rs9402349, rs7769712, IVS20 delT-11 та

Зв'язок роботи з науковими програмами

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень "Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин

на модель досягає рівня статистичної значущості ($P < 0,0001$).

Таким чином, результати проведеного комплексного аналізу показали, що при поєднанні будь-якого алельного варіанту та носіями мінорного Q-алеля, а також комбінація гетерозигот (С/Т) за SNP rs997509 та гомозигот (К/К) за SNP rs1044498 гена *ENPP1* збільшують ризик виникнення діабету 2-го типу в загальній популяції.

гомозиготами (С/С) за поліморфізмом 1-го інтрона гена *ENPP1* є предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

rs7754561) гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в українській популяції, а також проведення гаплотипного аналізу та вивчення комплексного впливу різних поліморфізмів.

нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії" (держ. реєстр. номер 0117U003926).

References (список літератури)

- Zheng Y, Ley SH, Hu Fr B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;1:1-11.
- Zaccardi Fr, Webb DR, Yates Th, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 2015;3:1-7.
- Guja C, Gagniu C, Ionescu-Tîrgoviște C. Genetic factors involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Proc. Rom. Acad.* 2012;1:44–61.
- Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven G, Accili D, Trischitta V, et al. The Role of Membrane Glycoprotein Plasma Cell Antigen 1/Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1 in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Related Abnormalities. *Endocr Rev*. 2008;29(1):62-75. doi: 10.1210/er.2007-0004.
- Bochenski J, Placha G, Wanic K et al. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals. *Diabetes*. 2006;55(9):2626-2630. doi: 10.2337/db06-0191.
- Yako YY, Madubedube JH, Kengne AP et al. Contribution of ENPP1, TCF7L2, and FTO polymorphisms to type 2 diabetes in mixed ancestry ethnic population of South Africa. *Afri Health Sci*. 2015;15(4):1149-1160. <http://dx.doi.org/10.4314/ahs.v15i4.14>.
- Marchenko IV, Prasol DA. Association of K121Q polymorphism in the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) gene in patients with type 2 diabetes having different BMI. *J.Clin.Exp.Med. Res*. 2015;3(4):543-9.
- Marchenko IV, Harbuzova YeA., Dubovyk YeI., Chumachenko Ya.D. [Analysis of association of the ENPP1 rs997509 polymorphism with type 2 diabetes in patients with obesity. *J. Clin. Exp. Med. Res*. 2018;6(1):170-175.

(received 15.05.2018, published online 29.06.2018)

(одержано 15.05.2018, опубліковано 29.06.2018)