

DOI: 10.26693/jmbs03.05.115

УДК 616.379-008.64:575.113.2(043.5)

Марченко І. В.

АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ RS997509-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *ENPP1* З ДЕЯКИМИ ФАКТОРАМИ РИЗИКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Сумський державний університет, Україна

i.marchenko@med.sumdu.edu.ua

Вивчення впливу різних факторів ризику на механізми розвитку цукрового діабету 2-го типу (ЦД 2-го типу) досі залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини, що вимагає вивчення потенційних маркерів діабету. Генетичний поліморфізм *ENPP1* rs997509 може бути спадковим фактором розвитку ЦД 2-го типу.

Мета дослідження – проаналізувати зв'язок rs997509-поліморфного варіанту гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу у пацієнтів з такими факторами ризику як стать, куріння та супутня артеріальна гіпертензія (АГ).

Використана венозна кров 317 пацієнтів з ЦД 2-го типу і 302 осіб контрольної групи. Визначення генотипів пацієнтів здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR-RFLP).

У результаті генотипування пацієнтів розділених на підгрупи за такими факторами ризику ЦД 2-го типу, як стать, куріння та супутня артеріальна гіпертензія виявлено, що існує достовірна різниця в співвідношенні гомозигот за основним алелем (С/С) та носіїв мінорного Т-алеля (С/Т + Т/Т) за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* у пацієнтів з ЦД 2-го типу та контрольної групи серед жінок ($P = 0,024$) та осіб з АГ ($P = 0,013$). Показано, що у носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу достовірно вище, ніж у гомозигот за основним алелем серед осіб жіночої статі (OR = 3,038; $P = 0,031$) та з супутньою АГ (OR = 3,271; $P = 0,018$).

У носіїв мінорного Т-алеля за SNP rs997509 гена *ENPP1* ризик розвитку ЦД 2-го типу достовірно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем. Ризик значно зростає в осіб жіночої статі та при наявності супутньої АГ в анамнезі.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, ген *ENPP1*, поліморфізм генів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень «Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації

тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії», № держ. реєстрації 0117U003926.

Вступ. Цукровий діабет 2-го типу (ЦД 2-го типу) є переважаючою формою діабету в усьому світі та однією з основних медико-соціальних проблем сучасного суспільства. За даними ВООЗ та Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) станом на 2015 рік у світі нараховувалось 386 млн хворих на дану патологію, а до 2030 року прогнозується збільшення кількості пацієнтів до 552 млн [4]. Епідеміологічні дослідження ЦД 2-го типу в Україні також свідчать про постійне збільшення числа хворих. Так, за останні 10 років темп приросту показника поширеності ЦД 2-го типу у нашій країні склав 43%, а кількість пацієнтів перевищила 2 млн осіб [2].

ЦД 2-го типу належить до групи мультифакторіальних хвороб, одним з важливих етіологічних факторів яких є генетична схильність. На сьогоднішній день існує значна кількість даних щодо участі поліморфних варіантів різних генів у формуванні схильності до розвитку ЦД 2-го типу [7]. Одним з таких є ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), білковий продукт якого пригнічує дію інсуліну [6]. При цьому відомо, що порушення функціонування *ENPP1* призводить до інсулінорезистентності, що є однією з основних патогенетичних ланок ЦД 2-го типу. Таким чином, можна припустити, що генетичний поліморфізм *ENPP1* може слугувати генетичним фактором розвитку ЦД 2-го типу. В українській популяції роботи щодо виявлення впливу rs997509-поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток ЦД 2-го типу не проводились, що спонукало нас до проведення даного дослідження.

Мета дослідження: проаналізувати зв'язок rs997509-поліморфного варіанту гена *ENPP1* з розвитком цукрового діабету 2-го типу у пацієнтів з такими факторами ризику як стать, куріння та супутня артеріальна гіпертензія.

Матеріал і методи досліджень. Робота проведена із використанням венозної крові 317 пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу (середній вік

64,9 ± 8,2 років). Відповідний діагноз у обстежених хворих було встановлено або підтверджено на основі анамнестичних даних, клінічних та біохімічних методів досліджень (клінічний аналіз крові та сечі, визначення глюкози крові, глікемічного профіля та глікозильованого гемоглобіну) та згідно з рекомендацій експертів ВООЗ.

До дослідження не включалися пацієнти із гострими чи хронічними запальними процесами на стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями, вираженою нирковою та печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмою або великим хірургічним втручанням, а також особи, які отримують препарати, що потенційно здатні впливати на рівень глюкози у крові, а саме: гормональні контрацептивні засоби, препарати замісної гормональної терапії та антипсихотична терапія при лікуванні шизофренії та/або тяжких біполярних захворювань.

Контрольна група у роботі представлена 302 особами (середній вік 65,1 ± 14,5 років) без цукрового діабету та порушень толерантності до глюкози. Відсутність інших мультифакторіальних хвороб підтверджувалася шляхом збирання анамнестичних даних, зняттям електрокардіограми, вимірюванням артеріального тиску та порведенням клінічних та біохімічних досліджень.

Дослідження проводилось з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини (1964 р., з наступними доповненнями, включаючи версію 2000 р.) і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженні з наступним забором венозної крові для генетичного аналізу.

Визначення аельного поліморфізму 1-го інтрона (rs997509) гена *ENPP1* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Детальна інформація щодо методики генотипування описана в попередніх наших публікаціях [1].

Статистичне опрацювання реалізовано із використанням програми SPSS (версія 17.0, США). Перевірку даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували χ^2 - критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку ЦД 2-го типу залежно від наявності в пацієнта певного генотипу за допомогою бінарної логістичної регресії розраховували відношення шансів (OR) та 95% довірчий інтервал (CI). Після цього для підвищення надій-

ності аналізу була використана мультиваріабельна логістична регресія.

Результати дослідження та їх обговорення.

Генотипування пацієнтів груп порівняння дало можливість встановити частоту генотипів за rs997509 поліморфізмом гена *ENPP1* в українській популяції (табл. 1). Виявили статистичну відмінність у розподілі генотипів серед хворих із ЦД 2-го типу та здоровими пацієнтами ($\chi^2 = 5,887$; $P = 0,015$). Так, в дослідній групі співвідношення гомозигот по основному алелю (C/C) та носіїв мінорного алеля (C/T + T/T) становило 89,0 та 11,0%, а в контролі – 94,4 та 5,6% відповідно. При порівнянні отриманих результатів з дослідженнями інших вчених виявлено відсутність достовірної різниці в розподілі генотипів між українцями та поляками ($P = 0,660$) і між українцями та італійцями ($P = 0,110$) [3, 8].

Таблиця 1 – Розподіл генотипів за rs997509 поліморфізмом гена *ENPP1* серед пацієнтів з різними факторами ризику у дослідній та контрольній групах

	Генотип	Конт- роль (%)	ЦД 2-го типу (%)	χ^2	P
Загальна група					
	C/C	94,4	89,0	5,887	0,015
	C/T + T/T	5,6	11,0		
Стать					
Жінки	C/C	95,3	87,0	5,072	0,024
	C/T + T/T	4,7	13,0		
Чоловіки	C/C	93,8	91,0	1,040	0,308
	C/T + T/T	6,2	9,0		
Фактори ризику діабету					
Куріння	C/C	92,6	84,2	2,714	0,099
	C/T + T/T	7,4	15,8		
АГ	C/C	96,6	89,5	6,161	0,013
	C/T + T/T	3,4	10,5		

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за χ^2 - критерієм.

Вивчення впливу різних факторів ризику на механізми розвитку ЦД досі залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини. Відомо, що з розвитком цукрового діабету 2-го типу пов'язані дві групи факторів ризику. До першої відносяться ті що не модифікуються – спадкова схильність, стать, етнічна приналежність, до другої – ті, на які можна вплинути в процесі життя, тобто модифіковані: ожиріння, куріння, супутня артеріальна гіпертензія, тощо. У результаті нашого дослідження ми проаналізували зв'язок статі, звички курити та супутньої артеріальної гіпертензії (АГ) в анамнезі з розвитком цукрового діабету.

Аналіз за статтю показав, що розподіл частот аельних варіантів за rs997509 поліморфним

сайтом гена *ENPP1* серед жінок та чоловіків у групах порівняння мають статистичні відмінності. Під час вивчення розподілу можливих генотипів за поліморфізмом 1-го інтрона гена *ENPP1* окремо серед осіб жіночої статі було встановлено, що хворих із ЦД 2-го типу гомозигот за основним С-алелем було 87%, а носіїв мінорного Т-алеля – 13%, (у групі порівняння це співвідношення становило 95,3 та 4,7% відповідно) ($\chi^2 = 5,072$; $P = 0,024$). Тобто, існує достовірний зв'язок між виникненням ЦД 2-го типу та жіночою статтю. Результати статистичного аналізу окремо серед осіб чоловічої статі продемонстрували, що розподіл генотипів достовірно не відрізняється між чоловіками із цукровим діабетом в анамнезі та контрольною групою. Виявлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С) та носіїв мінорного алеля (С/Т + Т/Т) у групі дослідження становило 91 та 9% (у контролі – 93,8 та 6,2% відповідно) ($\chi^2 = 1,040$; $P = 0,308$).

Серед курців достовірної різниці в розподілі С/С- і С/Т + Т/Т-генотипів у групах порівняння виявлено не було ($\chi^2 = 2,714$; $P = 0,099$). Проте виявлено, що існує достовірна різниця в частотах генотипів (С/С і С/Т + Т/Т) між пацієнтами із ЦД 2-го типу та контролем у підгрупі з супутньою артеріальною гіпертензією ($\chi^2 = 6,161$; $P = 0,013$). Серед пацієнтів з діабетом осіб з супутньою АГ було 89,5 та 10,5%, а в контролі – 96,6 та 3,4% відповідно. D. Zhou et al., у своїх роботах зазначили роль *ENPP1* як одного із важливих генів-кандидатів у розвитку ЦД 2-го типу та АГ [11]. Доведено, що коморбідність АГ та цукрового діабету потенціє кардіоваскулярний ризик [5, 10]. J. R. Sowers et al., у своїх роботах показали, що у хворих на цукровий діабет підвищення артеріального тиску зустрічається значно частіше, ніж у загальній популяції [9].

У табл. 2 подані результати вивчення зв'язку між досліджуваним SNP гена *ENPP1* та розвитком ЦД 2-го типу в осіб з різними факторами ризику за допомогою методів логістичної регресії.

Виявлено що серед жінок із СТ-генотипом ризик розвитку цукрового діабету вищий у 3 рази ($P_{\text{спост}} = 0,031$; $OR_{\text{спост}} = 3,038$). Цей зв'язок був підтверджений після урахування таких факторів ризику діабету, як вік, ІМТ, ожиріння, звичка курити та артеріальна гіпертензія ($P_{\text{попр}} = 0,040$; $OR_{\text{попр}} = 3,130$). Дослідження асоціації rs997509 поліморфних локусів першого інтрона гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі не встановив статистично значущого впливу ($P = 0,310$). З'ясовано, що досліджуваний поліморфний сайт не впливає на ризик виникнення діабету у курців ($P = 0,107$).

Таблиця 2 – Аналіз зв'язку rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з ЦД 2-го типу в осіб з різними факторами ризику з урахуванням СТ vs CC моделі успадкування

	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95% CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95% CI)
Загальна група				
СТ vs CC	0,017	2,081 (1,139–3,800)	0,027	2,086 (1,089–3,996)
Стать				
Жінки	0,031	3,038 (1,109–8,326)	0,040	3,130 (1,053–9,306)
Чоловіки	0,310	1,514 (0,679–3,376)	0,293	1,574 (0,676–3,665)
Фактори ризику діабету				
Куріння	0,107	2,344 (0,832–6,599)	0,152	2,353 (0,729–7,594)
АГ	0,018	3,271 (1,223–8,746)	0,045	2,792 (1,023–7,622)

Примітки: SNP – однонуклеотидний поліморфізм; 95% CI – 95 % довірчий інтервал; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); $OR_{\text{спост}}$ – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на вік, стать, звичку курити, ІМТ, ожиріння та АГ у загальній групі; $OR_{\text{попр}}$ – відношення шансів після поправки на коваріати.

Після поправки на коваріати значення P не мало статистичної значущості ($P_{\text{попр}} = 0,152$). Даний аналіз продемонстрував, що серед осіб з артеріальною гіпертензією носіїв Т-алеля ризик розвитку цукрового діабету був у 3,2 рази вищим (95% CI = 1,223–8,746; $P_{\text{спост}} = 0,018$), ніж у гомозигот за основним С-алелем. Ці результати підтверджувались після урахування віку, статі, ІМТ, ожиріння та звички курити пацієнта ($OR = 2,792$, CI = 1,023–7,622; $P_{\text{попр}} = 0,045$).

Висновки. Однонуклеотидний поліморфний варіант rs997509 гена *ENPP1* асоційований з розвитком цукрового діабету 2-го типу як в загальній популяції так і серед жінок. У носіїв мінорного Т-алеля ризик його розвитку достовірно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем. Ризик значно зростає в осіб жіночої статі та при наявності супутньої артеріальної гіпертензії в анамнезі.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи те, що у наших дослідженнях ми вивчаємо ще один поліморфізм даного гена – rs1044498, наступним кроком буде проведення гаплотипного аналізу гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу у осіб з різними факторами його ризику.

References

- Marchenko IV, Garbuzova YeA, Dubovyk Yel, Chumachenko YaD. Analiz asotsiatsiyi rs997509 polimorfizmu gena *ENPP1* z tsukrovym diabetom 2-go typu u patsiyentiv z ozhyrinniam. *J Clin Exp Med Res*. 2018; 6 (1): 170-75. [Ukrainian].
- Tkachenko VI, Vydoborets NV, Kovalenko OF. Analiz poshyrenosti ta zakhvoryuvanosti na tsukrovyy diabet i yogo uskladnennya sered naselennya Ukrainy ta u Kyuyivskiy oblasti za 2004-2013 rr. *Zdobutky klinichnoyi i eksperymentalnoyi medytsyny*. 2014; 2: 177-82. [Ukrainian].

3. Bochenski J, Placha G, Wanic K, Malecki M, Sieradzki J, Warram JH, Krolewski AS. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals. *Diabetes*. 2006; 55 (9): 2626-30. PMID: 16936213. doi: 10.2337/db06-0191.
4. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017; 14 (2): 88-98. PMID: 29219149. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151.
5. Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Tapan S. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008; 116 (5): 289-92. PMID: 18484561. DOI: 10.1055/s-2007-1004564.
6. Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven G, Accili D, Trischitta V, Vigneri R, Frittitta L. 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. PMID: 18199690. PMCID: PMC2244935. DOI: 10.1210/er.2007-0004.
7. Omar A. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013; 4 (4): 114-23. PMID: 23961321. PMCID: PMC3746083. doi: 10.4239/wjd.v4.i4.114.
8. Santoro N, Cirillo G, Lepore MG, Palma A, Amato A, Savarese P, Marzuillo P, Grandone A, Perrone L, Del Giudice EM. Effect of the rs997509 polymorphism on the association between ENPP1, metabolic syndrome and impaired glucose tolerance in childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94 (1): 300-5. PMID: 18940878. doi: 10.1210/jc.2008-1659.
9. Sowers JR. Treatment of hypertension in patients with diabetes. *Arch Intern Med*. 2004; 164: 1850–7. doi:10.1001/archinte.164.17.1850.
10. Stamler J, Stamler R, Neaton JD. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks: US population data. *Arch Intern Med*. 1993; 153: 598–615. PMID: 8439223.
11. Zhou D, Ruiter R, Zhang J, Zhou M, Liu H, Liu W, Wang S. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism is not associated with type 2 diabetes in a Chinese population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012; 13 (3): 372-8. PMID: 22392877. DOI: 10.1177/1470320311435535.

УДК 616.379-008.64:575.113.2(043.5)

**АНАЛИЗ СВЯЗИ RS997509-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ENPP1
С НЕКОТОРЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА**

Марченко И. В.

Резюме. Изучение влияния различных факторов риска на механизмы развития сахарного диабета 2-го типа (СД 2-го типа) до сих пор остается одной из наиболее актуальных проблем современной медицины, что наталкивает на изучение потенциальных маркеров диабета. Генетический полиморфизм *ENPP1* rs997509 может служить наследственным фактором развития СД 2-го типа.

Цель исследования – проанализировать связь rs997509-полиморфного варианта гена *ENPP1* с развитием сахарного диабета 2-го типа у пациентов с такими факторами риска как пол, курение и сопутствующая артериальная гипертензия.

Материалы и методы. Использована венозная кровь 317 пациентов с СД 2-го типа и 302 лиц контрольной группы. Определение генотипов пациентов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (PCR-RFLP).

Результаты. В результате генотипирования пациентов, разделенных на подгруппы по таким факторам риска СД 2-го типа, как пол, курение и сопутствующая артериальная гипертензия (АГ) обнаружено, что существует достоверная разница в соотношении гомозигот по основному аллелю (С/С) и носителей минорного Т-аллеля (С/Т + Т/Т) по rs997509-полиморфизму гена *ENPP1* у пациентов с СД 2-го типа и контрольной группы среди женщин ($P = 0,024$) и лиц с АГ ($P = 0,013$). Показано, что у носителей минорного Т-аллеля риск развития СД 2-го типа достоверно выше, чем у гомозигот по основному аллелю среди лиц женского пола ($OR = 3,038$; $P = 0,031$) и с сопутствующей АГ ($OR = 3,271$; $P = 0,018$).

Выводы. У носителей минорного Т-аллеля по SNP rs997509 гена *ENPP1* риск развития СД 2-го типа достоверно выше, чем у гомозигот по основному С-аллелю. Риск значительно возрастает у лиц женского пола и при наличии сопутствующей АГ в анамнезе.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, ген *ENPP1*, полиморфизм генов.

UDC 616.379-008.64:575.113.2(043.5)

**Analysis of rs997509-polymorphism of ENPP1 gene impact
on some risk factors of type 2 diabetes**

Marchenko I. V.

Abstract. The study of the impact of various risk factors on the mechanisms of diabetes development is still one of the most pressing problems of modern medicine. This leads to the study of potential diabetes markers for

early diagnosis of the development and progression of its complications, and in the long term, and new therapeutic options. The genetic polymorphism of *ENPP1* – rs997509 can serve a hereditary factor for the development of type 2 diabetes (T2DM).

The purpose of the study was to test the association between *ENPP1* rs997509 polymorphism and T2DM development in patients with different risk factors in the Ukrainian population.

Materials and methods. Venous blood of 317 patients with T2DM and 302 healthy volunteers was used for analysis. *ENPP1* rs997509 genotyping was performed using PCR-RFLP (polymerase chain reaction with following restriction fragment length polymorphism analysis) method.

Results and discussion. All the surveyed were divided into subgroups according to such factors as sex, smoking, and concomitant arterial hypertension. As a result of genotyping these subgroups of patients, we observed a significant difference in the ratio of homozygotes for the main allele (C/C) and carriers of the minor T-allele (C/T+T/T) for rs997509-polymorphism of the *ENPP1* gene in patients with T2D and control group in women ($P = 0.024$) and subjects with hypertension ($P = 0.013$). It was shown that in the carriers of the minor T-allele the risk of development of T2D was significantly higher than that of the homozygote by the main allele in females (OR = 3.038; $P = 0.031$) and with concomitant hypertension (OR = 3.271; $P = 0.018$).

Conclusions. The risk of developing T2DM is significantly higher in the carriers of the SNP rs997509 minor T allele of the *ENPP1* gene, than that of the homozygote in the main C allele. The risk is significantly increased in females with concomitant hypertension.

Keywords: Type 2 diabetes, *ENPP1* gene, gene polymorphism.

Стаття надійшла 07.04.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування