

Abstract

I. V. Marchenko,
Ye. A. Harbuzova,
Ye. I. Dubovyk,
Ya. D. Chumachenko,
*Sumy State University, 2,
Rymського-Korsakova st., Sumy,
Ukraine*

**ANALYSIS OF ASSOCIATION OF THE ENPP1 RS997509
POLYMORPHISM WITH TYPE 2 DIABETES IN PATIENTS
WITH OBESITY**

Introduction. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a multifactorial disease with leading genetic determinism. Full-genome association studies identified a large number of polymorphic loci associated with type 2 diabetes. One of the candidate genes is the Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) gene. Studies in humans have shown a correlation between *ENPP1* polymorphisms, including rs997509 and type 2 diabetes mellitus, obesity, insulin resistance and metabolic syndrome in different populations of the world.

Purpose. Study of rs997509 polymorphic variant associations of *ENPP1* gene with type 2 diabetes mellitus in patients with obesity in the Ukrainian population.

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

Discussion. The results of the study show that among the patients without obesity the ratio of genotypes in the experimental and control groups is not significantly different ($P = 0.709$). Among patients with type 2 diabetes and obesity, the distribution of genotypes C/C, C/T and T/T was 81 %, 19 % and 0 %, and in subjects without diabetes 92, 4 %, 7.6 % and 0 % ($P = 0.024$). There is a significant difference in the distribution of genotypes by rs997509 polymorphism among obese individuals. The method of binary logistic regression revealed a reliable association of the studied polymorphism with type 2 diabetes in the group as a whole ($P = 0.017$) and in the subgroup with obesity ($P = 0.029$).

Conclusion. It was shown that risk of T2DM development in T allele carriers is significantly higher compared to C/C homozygotes in patients with obesity (OR = 3.230; $P = 0.023$).

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

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

Резюме

I. В. Марченко,
Є. А. Гарбузова,
Є. І. Дубовик,
Я. Д. Чумаченко,
*Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова,
2, м. Суми, Україна, 40007*

**АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ RS997509 ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА
ENPP1 З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ У ПАЦІЄНТІВ
З ОЖИРІННЯМ**

Мета роботи. Проаналізувати асоціацію rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом (ЦД) 2-го типу у пацієнтів з ожирінням.

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 виконано за допомогою програми SPSS (версія 17.0).

Результати. При аналізі отриманих нами даних виявлено, що серед пацієнтів із ЦД 2-го типу, які страждають на ожиріння, розподіл генотипів С/С, С/Т і Т/Т становив - 81 %, 19 % і 0 %, а в осіб без ЦД 2-го типу – 92,4 %, 7,6 % і 0 % ($P = 0,024$). Серед осіб без ожиріння співвідношення генотипів у дослідній і контрольній групах достовірно не відрізнялись ($P = 0,709$). Це свідчить про існування достовірної різниці в розподілі генотипів за rs997509 поліморфізмом серед осіб з ожирінням, які страждають на ЦД 2-го типу і здорових людей. Метод бінарної логістичної регресії виявив достовірний зв'язок вивченого поліморфізму з ЦД 2-го типу як в групі в цілому ($P = 0,017$), так і в підгрупі з ожирінням ($P = 0,029$).

Висновок. Показано, що у носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу в осіб з ожирінням достовірно вище, ніж у гомозигот за основним С-алелем ($OR = 3,230$; $P = 0,023$).

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

Резюме

И. В. Марченко,

Е. А. Гарбузова,

Е. И. Дубовик,

Я. Д. Чумаченко,

Сумський державний університет, ул. Римського-Корсакова, 2, г. Сумы, Україна

АНАЛИЗ АССОЦИИИ RS997509 ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ENPP1 С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Цель работы. Проанализировать ассоциацию rs997509 полиморфизма гена *ENPP1* с сахарным диабетом (СД) 2-го типа у пациентов с ожирением.

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 группы. Статистический анализ выполнен с помощью программы SPSS (версия 17.0).

Результаты. При анализе полученных нами данных выявлено, что среди пациентов с СД 2-го типа, страдающих ожирением, распределение генотипов С/С, С/Т и Т/Т составило - 81 %, 19 % и 0 %, а у лиц без СД 2-го типа - 92,4 %, 7,6 % и 0 % ($P = 0,024$). Среди лиц без ожирения соотношения генотипов в опытной и контрольной группах достоверно не отличались ($P = 0,709$). Это свидетельствует о существовании достоверной разницы в распределении генотипов по rs997509 полиморфизму среди лиц с ожирением, страдающих СД 2-го типа и здоровых людей. Методом бинарной логистической регрессии выявлено достоверную связь изученного полиморфизма с СД 2-го типа как в группе в целом ($P = 0,017$), так и в подгруппе с ожирением ($P = 0,029$).

Вывод. Показано, что у носителей мінорного Т-аллеля риск развития СД 2-го типа у лиц с ожирением достоверно выше, чем у гомозигот по основному С-аллелю ($OR = 3,230$; $P = 0,023$).

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, ген РС-1, ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, поліморфізм генів.

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



Вступ

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД 2-го типу) – це мультифакторіальне та полігенне захворювання, що має складний патогенез, в основі якого лежать інсулінорезистентність та дисфункція β -клітин підшлункової залози. На сьогоднішній день ідентифіковано велику кількість однонуклеотидних поліморфізмів (SNP), що належать генам, експресія яких визначає синтез інсуліну, функціонування β -клітин, кількість і чутливість інсулінових рецепторів, концентрацію глюкози в плазмі та розвиток ожиріння [1; 2]. На даний час налічується більше 200 відомих генів-кандидатів у розвитку ЦД 2-го типу [3]. Одним із таких генів є екзонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*, *PC-1*), який за рахунок впливу на тирозинкіназну активність α -субодиниці рецептора інсуліну призводить до інсулінорезистентності [4]. Відомо, що експресія *ENPP1* виражена у тканинах, чутливих до інсуліну, таких як печінка, скелетні м'язи та жирова тканина, а також інших тканинах пацієнтів з ЦД 2-го типу. Доведено, що надекспресія *ENPP1* у культивованих клітинах викликає в них меншу чутливість до інсуліну [5]. У результаті експериментів виявлено, що у трансгенних тварин, з вираженою експресією *ENPP1* у різних тканинах, розвивається інсулінорезистентність та цукровий діабет 2-го типу [6]. Клінічним підтвердженням того, що поліморфні варіанти гена *ENPP1* пов'язані з інсулінорезистентністю та можуть бути використані в якості маркера ЦД 2-го типу, є його посиленний інгібуючий ефект на рецептор інсуліну [4; 7]. Останнім часом активно вивчається поліморфізм 1-го інтрону гена *ENPP1*. Суть цього поліморфізму полягає у заміні цитозину на тимін у 43822 положенні гена. Існує ряд доказів того, що rs997509 поліморфізм даного гена асоційований з розвитком цукрового діабету, ожирінням, інсулінорезистентністю та метаболічним синдром у різних популяціях світу [8–11]. У зв'язку з чим, метою даного дослідження став аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з наявним чи відсутнім ожирінням в українській популяції.

Матеріали і методи. У дослідженні використано венозну кров 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 $65,1 \pm 14,5$). Робота виконана відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи ме-

дичних 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. Для визначення генотипів пацієнтів венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвої сілью етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянту («Sarstedt», Німеччина) і зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія). Визначення rs997509 поліморфізму 1-го інтрону гена *ENPP1* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ділянку зазначеного гена ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (forward) 5'CTACCAATATGGGCCACTGAT3' і зворотного (reverse) 5'CTGGACCAAGTGTACCACAAA3' («Metabion», Німеччина). Суміш для ампліфікації складалася з 50–100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфату магнію, 150 мкм суміші чотирьох нуклеозидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази («Thermo Scientific», США). Обсяг суміші доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента 1-го інтрону, що містить C43822T-сайт, складалася з 35 циклів: 1 цикл – $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 хв), з 2 по 34 цикл – денатурація – $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (50 с), гібридизація праймерів – $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 с) і елонгація – $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 хв), 35 цикл – $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 16 годин з 2 ОД рестриктази SsiI (AciI) («Thermo Scientific», США) в буфері О наступного складу: 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію і 0,1 мг/мл альбуміну. Результати рестрикційного аналізу оцінювали наступним чином: якщо в 43822-й позиції гена *ENPP1* знаходився цитозин, ампліфікат (475 пари основ), розщеплювався рестриктазою SsiI на два фрагменти – 223 і 252 пари основ; в разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для SsiI був відсутній, і в суміші виявлявся один фрагмент розміром 475 пари основ. Ампліфікати вивчених фрагментів 1-го інтрону гена *ENPP1* розділяли в 2,5 % агарозному гелі, який



містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводився протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія). Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними. Для прогнозування ризику виникнення ЦД 2-го типу у носіїв мінорного алеля використовували метод логістичної регресії ($P < 0,05$ – статистична значущість; OR – відношення ризику).

Результати та їх обговорення. Доведено, що одним із найбільш прогнозованих факторів ризику ЦД 2-го типу є ожиріння. Повногеномні дослідження (GWAS) свідчать про численні ОНП, які підвищують ризик виникнення цукрового діабету 2-го типу у осіб з ожирінням та надлишковою масою тіла, але їх вплив на ознаки та ризик ЦД не зовсім зрозумілі [12]. Тому, в

дослідженні ми проаналізували асоціацію rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням. Поділ кожної з двох груп – дослідної і контрольної – на дві підгрупи залежно від наявного чи відсутнього супутнього ожиріння, дав можливість виявити вплив поліморфного варіанту гена *ENPP1* на розвиток ЦД 2-го типу в осіб із ожирінням (Таблиця 1). У результаті аналізу отриманих даних бачимо, що серед пацієнтів без ожиріння співвідношення генотипів в дослідній і контрольній групах достовірно не відрізняється ($P = 0,709$). Серед пацієнтів із ЦД 2-го типу, які страждають на ожиріння, розподіл генотипів С/С, С/Т і Т/Т становив – 81 %, 19 % і 0 %, а в осіб без ЦД 2-го типу – 92,4 %, 7,6 % і 0 %. Показник P , який розраховували за допомогою χ^2 -критерію Пірсона дорівнював 0,024, що свідчить про існування достовірної різниці в розподілі генотипів за rs997509 поліморфізмом серед осіб з ожирінням.

Таблиця 1 – Розподіл генотипів за rs997509 поліморфізмом гена *ENPP1* у пацієнтів з ожирінням

| Група | n | Генотип, n (%) | | | P |
|---------------------|-----|----------------|-----------|-------|-------|
| | | С/С | С/Т | Т/Т | |
| Без ожиріння | | | | | |
| ЦД 2-го типу | 191 | 180 (94,2) | 11 (5,8) | 0 (0) | 0,709 |
| Контроль | 223 | 212 (95,1) | 11 (4,9) | 0 (0) | |
| Ожиріння | | | | | |
| ЦД 2-го типу | 126 | 102 (81,0) | 24 (19,0) | 0 (0) | 0,024 |
| Контроль | 79 | 73 (92,4) | 6 (7,6) | 0 (0) | |

Примітка: n – кількість пацієнтів

У таблиці 2 представлені результати регресійного аналізу асоціації генотипів за rs997509 поліморфізмом гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу у осіб з ожирінням. Метод бінарної логістичної регресії виявив достовірний зв'язок вивченого поліморфізму з ЦД 2-го типу як в групі в цілому ($P = 0,017$), так і в підгрупі з ожирінням ($P = 0,029$). Ці дані були підтвержені після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку палити. Виявлено, що у осіб з ожирінням носіїв мінорного Т-алелю ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу достовірно вище, ніж у гомозигот за основним С-алелем (OR = 3,230; $P = 0,023$).

Аналогічні дані в своїх роботах отримали польські вчені Vochenski J. et al., які показали асоціацію rs997509 поліморфізму 1-го інтрону

гена *ENPP1* з високим ризиком розвитку ЦД 2-го типу у осіб з ожирінням [8]. У дослідженнях південноафриканської популяції Matsha T. et al. виявили достовірну різницю у розподілі генотипів за rs997509 поліморфізмом серед пацієнтів з ожирінням та контрольною групою ($p = 0,010$). Автори стверджують, що у носіїв Т-алелю ризик виникнення ожиріння значно вище ($p = 0,024$) [9]. Yako Y. et al. довели зв'язок мінорного Т-алеля з ризиком розвитку ЦД 2-го типу у жителів Південної Африки [10]. Santoro N. et al. досліджуючи роль rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* у розвитку інсулінорезистентності зробили висновок, що мінорний Т-алель може бути асоційований з метаболічним синдромом та порушенням толерантності до глюкози у дітей з ожирінням [11].



Таблиця 2 – Аналіз асоціації генотипів за rs997509 поліморфізмом гена ENPP1 з ризиком ЦД 2-го типу у пацієнтів з ожирінням

| | Модель | P _c | OR _c (95 % CI) | P _{попр} | OR _{попр} (95 % CI) |
|-----------------------|----------|----------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|
| Загальна група | | | | | |
| | CT vs CC | 0,017 | 2,081 (1,139–3,800) | 0,027 | 2,086 (1,089–3,996) |
| Ожиріння | | | | | |
| Без ожиріння | CT vs CC | 0,709 | 1,178 (0,499–2,781) | 0,473 | 1,396 (0,562–3,467) |
| Ожиріння | CT vs CC | 0,029 | 2,863 (1,114–7,356) | 0,023 | 3,230 (1,175–8,881) |

Примітка: 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; P_c – спостережуване значення P (без поправки на коваріації); OR_c – спостережуване відношення шансів; P_{попр} – значення P після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку курити; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріації

Висновки

Існує достовірна різниця в розподілі генотипів за rs997509 поліморфізмом гена ENPP1 серед осіб з ожирінням у групі цукрового діабету та контролі (P = 0,024). Виявлено, що у осіб з

ожирінням носіїв мінорного T-алелю ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу значно вище, ніж у гомозигот за основним C-алелем (OR = 3,230; P = 0,023).

Зв'язок роботи з науковими програмами

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

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

References (список літератури)

1. Guja S, Gagniuc P, Ionescu-Tîrgoviște C. Genetic factors involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. Proc. Rom. Acad. 2012;1:44–61.
2. Sanghera DK, Blakett PR. Type 2 diabetes genetics: beyond GWAS. J Diabetes Metab. 2012;3(05):2–17. doi:10.4172/2155-6156.1000198.
3. Gaulton KJ, Willer CJ, Li Y et al. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. Diabetes. 2008;57(11):3136-3144. doi:10.2337/db07-1731.
4. 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.
5. Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren JF, Fisher A, Spencer S, Grupe A, Henzel W, Stewart TA, Reaven G, Goldfine I 1995 Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 373:448–451
6. Maddux BA, Chang YN, Accili D et al. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290:E746–E749
7. Heather H. Zhoua, Chen-Ni Chingb, MargaretWuc et al. Suppression of PC-1/ENPP-1 expression improves insulin sensitivity in vitro and in vivo. European Journal of Pharmacology 2009;616(1-3):346-352. https:// doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.057
8. 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.



9. 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>.
10. Matsha T, Fanampe B, Yako Y et al. Association of the ENPP1 rs997509 polymorphism with obesity in South African mixed ancestry learners. *East Afr Med J.* 2010;87(8):323-329.
11. Santoro N, Cirillo G, Lepore MG et al. 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):300-305. doi: 10.1210/jc.2008-1659.
12. S Robiou-du-Pont, A Bonnefond, L Yengo et al. Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population. *International Journal of Obesity* 2013;37:980–985.
doi:10.1038/ijo.2012.175

(received 123465, published online 123465)

(одержано 123645, опубліковано 123645)

