

УДК: 617.58-002.4-003.93-08:616.379-008.64

УКПП

№ держреєстрації 0117U003926

Інв. №

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет  
(СумДУ)

40007, Україна, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, тел. (0542) 33 41 08

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи  
д-р. фіз-мат. наук, проф.

\_\_\_\_\_ А.М. Черноус

10.12.2018

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

ВСТАНОВЛЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ САЙТІВ ГЕНІВ BGLAP, ENPP1 І VEGF-A ІЗ РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ ТА ВИЯВЛЕННЯ МІКРОСКОПІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИН НИЖНЬОЇ КІНЦІВКИ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ  
(проміжний)

Начальник НДЧ,  
канд. фіз-мат. наук, с.н.с.

10.12.2018

Д.І. Курбатов

Керівник НДР,  
канд. мед. наук, с.н.с.

10.12.2018

Є.І. Дубовик

2018

Результати роботи розглянуто науковою радою Сумського державного університету, протокол від 27 листопада 2018 р. № 5

## СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.мед.н., асистент кафедри фізіології і патофізіології	10.12.2018	Є.І. Дубовик (розділ 2-5, висновки)
Відповідальний виконавець: к.мед.н., асистент кафедри стоматології	10.12.2018	О.О. Тимошенко (вступ, розділ 6)
Відповідальний виконавець: аспірант кафедри морфології	10.12.2018	О.С. Максимова (розділ 6, висновки)
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	10.12.2018	І.В. Марченко (розділ 2-5 )
Аспірант кафедри фізіології і патофізіології	10.12.2018	І.Г. Фоменко (передмова, розділ 2)
Фахівець	10.12.2018	Д.В. Годовас (вступ, перелік посилання)
Студент медичного інституту	10.12.2018	Я.Д. Чумаченко (розділ 1.1)
Студентка медичного інституту	10.12.2018	К.О. Пастухова (розділ 1.2)
Студентка медичного інституту	10.12.2018	В. О. Кір'ян (передмова)
Студент медичного інституту	10.12.2018	Н.С. Мчедлішвілі (перелік посилання)
Студент медичного інституту	10.12.2018	Д.В. Муравський (розділ 1.1)
Студентка медичного інституту	10.12.2018	М.І. Даниленко (розділ 1.2)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 57 с., 6 ч., 15 табл., 92 джерела.

### ГІПЕРГЛІКЕМІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ, РЕГЕНЕРАЦІЯ, ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ, ENPP1, VEGF-A, BGLAP

Об'єкт дослідження – процес регенерації тканин за умов хронічної гіперглікемії.

Мета роботи – встановлення молекулярно-генетичних та морфологічних особливостей регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії

Методи дослідження – полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів, біохімічний, спектрофотометричний, мікрота ультраструктурний аналіз та методи математичного аналізу.

Уперше встановлено, що K121Q-поліморфізм гена ENPP1 асоційований із розвитком цукрового діабету 2-го типу (ЦД2) в українській популяції ( $P = 0,050$ ). У носіїв мінорного Q-алеля ризик настання ЦД2 в 1,4 рази вище, ніж у гомозигот за основним K-алелем ( $P = 0,027$ ). Показано, що ризик зростає у пацієнтів з  $ІМТ \geq 25$  кг/м<sup>2</sup>. Також уперше був виявлений зв'язок поліморфного сайту rs997509 гена ENPP1 із розвитком ЦД2 у вітчизняній популяції ( $P = 0,015$ ). Математичний аналіз показав, що у носії мінорного T-алеля ризик захворіти у 2,1 рази вищий, ніж в осіб, що є гомозиготами за основним алелем ( $P = 0,027$ ). Поряд з цим встановлена достовірна різниця у 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 ( $OR = 3,230$ ;  $P = 0,023$ ). Асоціації досліджуваних поліморфних сайтів генів VEGF-A і BGLAP із розвитком ЦД2 в українській популяції виявлено не було. Встановлено, що у скелетних м'язах щурів із хронічною гіперглікемією спостерігається зменшення вмісту K, Ca, Zn, Fe та Cu, порівняно із тваринами без порушень вуглеводного обміну.

## ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	5
Передмова	6
Вступ	7
1 Огляд літератури з питань структурних та біохімічних властивостей ENPP1 і VEGF-A	9
1.1 Будова та біохімічні властивості ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1	9
1.2 Структура та функція судинного ендотеліального фактору росту А	11
2 Аналіз асоціації rs1044498-поліморфізму гена ENPP1 із розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції	20
3 Вивчення зв'язку rs997509-поліморфізму гена ENPP1 із настанням цукрового діабету 2-го типу в українській популяції	28
4 Роль поліморфного сайту rs997509 гена ENPP1 у розвитку цукрового діабету 2-го типу у пацієнтів з ожирінням	34
5 Дослідження асоціації генетичного поліморфізму VEGFA та BGLAP із ризиком розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції	37
6 Вивчення особливостей макро- та мікроелементного складу скелетних м'язів щурів за умов хронічної гіперглікемії	42
Висновки	47
Перелік джерел посилання	48

**ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ**

ЦД – цукровий діабет

АТ – артеріальний тиск

ІМТ – індекс маси тіла

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатаза/фосфодіестераза 1

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

G – гуанін

A – аденін

T – тимін

C – цитозин

BGLAP – кістковий Gla-протеїн (остеокальцин)

VEGF-A – судинний ендотеліальний фактор росту A

## ПЕРЕДМОВА

До числа найтяжчих проявів цукрового діабету відносять порушення регенерації тканин, що відіграє провідну роль у патогенезі синдрому діабетичної стопи. Згідно з даними Міжнародної федерації діабету, понад 50 % пацієнтів з цукровим діабетом (кількість яких на сьогодні у світі перевищує 300 млн осіб) знаходяться у групі ризику розвитку цього небезпечного стану. У майже половини з них хвороба діагностується на пізніх стадіях, що потребує ампутації ураженої кінцівки та збільшує ймовірність летального наслідку у 2 рази. Слід також відмітити, що вартість лікування синдрому діабетичної стопи на запущених стадіях у 3 рази вища, ніж у ранній період.

За даними сучасних клінічних досліджень, своєчасна діагностика із залученням методів молекулярно-генетичного аналізу та своєчасне лікування діабетичної стопи дозволяють знизити ризик ампутації на 43-85 %. Враховуючи нещодавно відкриту роль білка остеокальцину в регуляції метаболізму глюкози шляхом посилення її захоплення міоцитами, впливу на експресію гена інсуліну і проліферацію  $\beta$ -клітин підшлункової залози генетична варіабельність BGLAP, як і ENPP1, білковий продукт якого здатен впливати на чутливість клітин до інсуліну, може стати новим діагностичним маркером та предиктором як цукрового діабету, так і ймовірності розвитку його ускладнень, що пов'язані з порушенням процесів регенерації. Крім того, однією з важливих патогенетичних ланок розвитку діабетичної стопи є порушення васкуляризації в дистальних відділах нижніх кінцівок. Ймовірність такої події можна оцінити шляхом визначення структурних особливостей гена VEGF-A, що кодує судинний фактор росту – основний регулятор неоваскулогенезу.

Поряд з цим актуальність вивчення морфологічних особливостей перебігу регенераторних процесів тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії на мікроскопічному та ультрамікроскопічному рівні базується на відсутності таких даних, які б дозволили більш повно зрозуміти перебіг вказаних процесів та створити теоретичне підґрунтя для розробки ефективних шляхів їх корекції.

## ВСТУП

Упродовж останніх десятиліть активно вивчаються клітинні та молекулярно-генетичні механізми розвитку захворювань ендокринної, м'язової та кісткової систем [1]. Більшість сучасних досліджень присвячені вивченню асоціації поліморфізму гена VDR та BGLAP із біохімічними маркерами кісткового ремоделювання і ступенем демінералізації кісткової тканини [2]. Поряд з тим нещодавно було показано, що остеокальцин здатний регулювати експресію гена інсуліну і стимулювати проліферацію  $\beta$ -клітин підшлункової залози [3]. Тривале лікування остеокальцином попереджає збільшення маси тіла і виникнення порушень вуглеводного обміну при високожировому харчуванні [4].

Револьюційним виявилось дослідження, в якому у остеокальцин-дефіцитних тварин спостерігався фенотип із порушенням толерантності до глюкози, інсулінорезистентністю і вісцеральним ожирінням [5]. *In vitro* було показано, що остеокальцин підвищує секрецію інсуліна острівцями Лангерганса і збільшує чутливість адипоцитів до інсуліну [6]. Введення рекомбінантного остеокальцину щурам із ожирінням підсилює проліферацію  $\beta$ -клітин підшлункової залози, стимулює секрецію інсуліну та покращує чутливість тканин до інсуліну [7]. Імуногістохімічна картина підшлункової залози щурів, які отримували інфузії остеокальцина демонструє збільшення числа острівців і  $\beta$ -клітинної маси [8]. При морфологічному аналізі скелетних м'язів методом просвічуючої електронної мікроскопії було доведено збільшення числа і розміру мітохондрій у тих тварин, які отримували остеокальцин.

Що стосується перебігу регенерації тканин нижніх кінцівок у хворих на цукровий діабет, то це питання мало вивчене. Більшість дослідників вважають, що цукровий діабет уповільнює репаративні процеси, що призводить до частих ускладнень, зокрема до синдрому діабетичної стопи, та подовженню термінів регенерації [9]. Разом з тим ряд вчених стверджують, що у хворих з компенсованим цукровим діабетом терміни репаративних процесів мало чим відрізняються від таких у пацієнтів, які не страждають на це захворювання. Дані

різних авторів про репаративні можливості у хворих на цукровий діабет засновані здебільшого на клінічних спостереженнях. Експериментальних же робіт з цього питання вкрай мало.

Таким чином, у роботі буде вперше вивчено роль генетичної варіабельності *BGLAP*, *ENPP1* та *VEGF-A* із розвитком цукрового діабету та реалізовано експериментальне дослідження щодо вивчення морфологічних особливостей регенераторних процесів тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії. Робота у цьому напрямі може мати важливе практичне значення, оскільки знання про нові генетичні маркери дозволить прогнозувати ризик розвитку цукрового діабету 2 типу та його гіпорегенераторних ускладнень та, спираючись на це, пропонувати засоби превентивного лікування та ефективної профілактики, що поліпшить якість життя і його тривалість у населення України.



# 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПИТАНЬ СТРУКТУРНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ENPP1 і VEGF-A

## 1.1 Будова та біохімічні властивості ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1

Ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестераза 1 (ENPP1) є одним із членів сімейства нуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази, що складається з ізоферментів зі структурно спорідненими каталітичними доменами. Всі члени сімейства пронумеровані від ENPP1 до ENPP7 відповідно до порядкового номера клонування. Лише три ферменти сімейства – ENPP1, ENPP2 і ENPP3 – здатні гідролізувати пірофосфатні та фосфодієфірні зв'язки [10].

ENPP1 – фермент, що має широку специфічність: проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням 22 неорганічного пірофосфату (PPi), фосфодіестеразну активність – шляхом утворення АМФ із цАМФ [11].

ENPP1 є гомодимерним трансмембранним білком, що міститься в плазматичних мембранах клітин і матричних везикулах. Білок ENPP1 людини складається з 925 амінокислотних залишків та має молекулярну масу приблизно 125 кДа [12]. Протеїн зазнає посттрансляційної модифікації у вигляді аутофосфорилування як частини каталітичного циклу в активуванні пірофосфатази/фосфодіестерази 1, а також глікозилювання N-кінця.

Молекула білка ENPP1 складається з 5 частин: внутрішньоклітинного домену (із N-кінцевою спіраллю), двох соматомедин-B-подібних доменів і двох каталітичних позаклітинних доменів (фосфодіестеразоподібного і нуклеазоподібного) [13, 14].

Внутрішньоклітинний домен містить аміногрупу і складається з 24–76 залишків. Більша частина домену знаходиться в мембрані, і лише незначна частина – у цитоплазмі. Це є специфічною особливістю 3 ферментів сімейства – ENPP1, ENPP2, ENPP3 – і відрізняє їх від інших членів, N-кінець яких розміщений поза клітиною [15].

Два багатих на цистеїн соматомедин-В-подібних (SMB-1 і SMB-2) домени довжиною 40–50 амінокислотних залишків знаходяться між трансмембранним і каталітичним доменами. На думку Н. Zimmermann et al., таке розміщення SMB-доменів забезпечує стабілізацію молекули ENPP1 [16]. Свою каталітичну активність фермент виявляє у формі гомодимеру. Об'єднання відбувається за рахунок утворення дисульфідних містків між молекулами цистеїну SMB-доменів двох мономерів ENPP1 [17]. Необхідно зазначити, що досліджений K121Q поліморфізм міститься в домені SMB-2 білка ENPP1 [18]. Сьогодні не відомий можливий механізм зв'язку заміни лізину (K) на глутамін (Q) у 121-му положенні молекули з каталітичною активністю ферменту.

Фосфодіестеразоподібний домен знаходиться між SMB-2 і нуклеазоподібним доменом і складається приблизно з 400 амінокислот. 23 Фосфодіестеразна активність білка здійснюється шляхом утворення АМФ із цАМФ [19]. Нуклеазоподібний домен містить карбоксильну групу, спрямовану в позаклітинне середовище. Довжина цього домена приблизно 250 амінокислот [18, 19]. ENPP1 проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням неорганічного пірофосфату (PPi). С. Stefan et al. довели, що каталітичні домени ENPP1 мишей мають високу ідентичність із людськими ізоформами (до 60 % амінокислот) [20].

Ira D. Goldfine et al. зазначають, що каталітичні домени забезпечують розщеплення глюкозофосфатних, фосфосульфатних, пірофосфатних і фосфодіестеразних зв'язків [21]. Автори зазначають, що активний центр ферменту пірофосфатази і фосфодіестерази містить залишок треоніну-204. Каталітична активність ENPP1 залежить від двовалентних катіонів та оптимальна при рН 9–10 [19].

Білок ENPP1 експресується в епітеліальних клітинах дихальних шляхів [22], печінки [23], нирках [24], судинах [24], відіграючи важливу роль у функціонуванні вищезазначених органів і тканин. Відомо, що ENPP1 є інгібітором інсулінових рецепторів. Взаємодіючи з  $\alpha$ -субодиницею рецептора, він пригнічує активність тирозинкінази, викликаючи інсулінорезистентність [25].

Miao-Pei Chen et al. зазначають, що рівень інсулінорезистентності залежить від активності ENPP1 [25].

Ген ENPP1 міститься на довгому плечі 6 (6q22–23q) хромосоми, має 25 екзонів і 24 інтрони [26, 27]. Регуляцію експресії гена ENPP1 контролює ціла низка регулювальних чинників, зокрема глюкокортикоїди [28], активатори протеїнкінази С [29], фактори росту фібробластів [30], цитокіни (IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ ) [31]. А. Abhishek і М. Doherty зазначають, що експресія гена ENPP1 залежить від TGF- $\beta$  (трансформуючого фактора росту- $\beta$ ), IGF1 (інсуліноподібного фактора росту 1), CILP (cartilage intermediate layer protein). За даними вчених, TGF- $\beta$  і CILP підвищують експресію ENPP1, IGF1 та IL-1 $\beta$  її зменшують [32]. На сьогодні відомо близько 2 тисяч однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена *ENPP1* людини. Найкраще дослідженими з яких є K121Q (rs1044498), IVSdelT-11 (rs1799774), A/G +1044TGA (rs7754561) [33, 34].

## 1.2 Структура та функція судинного ендотеліального фактору росту А

Фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor – VEGF) – сімейство білків, що мають схожу структуру і разом з рецепторами (VEGFR) відіграють важливу роль у розвитку і регуляції діяльності кровоносних та лімфатичних судин. VEGF відповідає за формування судинної системи у період ембріогенезу та ранній постнатальний період. Рівень його експресії зменшується після народження і у дорослої людини тримається на мінімальному рівні за виключенням місць активного ангиогенезу (оварії, матка, шкіра). Крім того, експресія VEGF суттєво посилюється під час патологічного ангиогенезу (ішемія міокарду, сітківки, запалення, атеросклеротична бляшка, пухлини) [35-38].

VEGF має вузьку специфічність тканин-мішеней. Виявляючи сильний мітотичний вплив на ендотеліальні клітини артеріальних, венозних та лімфатичних судин, він, проте, позбавлений помітної мітотичної активності щодо інших типів клітин [39].

VEGF був виділений у 1989 році американцем італійського походження Napoleon Ferrara, ним же клонована ДНК білка [40]. VEGF був відкритий у пухлинах як неідентифікований фактор, що збільшує проникність мікросудин для рідини (судинний фактор проникності, VPF). Пізніше було показано, що білок може чинити мітогенний вплив на ендотеліальні і моноцитарно-макрофагальні клітини, які мають на поверхні рецептори до нього [35].

Сімейство VEGF складається з 8 членів: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F і плацентарних факторів PlGF-1, PlGF-2 [41].

Основним представником сімейства факторів росту ендотелію судин є VEGF-A, всі ефекти якого поділяють на судинні та позасудинні. VEGF-A є потужним мітогеном клітин ендотелію судин, забезпечує міграцію ендотеліоцитів, їх інвазію у колагеновий гель і утворення нових судин. VEGF-A необхідний не тільки для формування нормальних судин, але і для їх дозрівання і виживання. Як надлишок так і нестача його веде до смерті ембріона в результаті порушення васкуло- і ангиогенезу [35]. Тривале зниження концентрації або блокада VEGF у дорослих призводить до погіршення виживання ендотеліальних клітин, зменшенню в тканинах термінальних артеріол і капілярів, підвищенню артеріального тиску [42].

Важливою функцією VEGF є його здатність підвищувати проникність судинної стінки за рахунок утворення фенестр в ендотеліальних клітинах [43]. Доведено, що при взаємодії з рецептором VEGF підвищує як парацеллюлярну, так і трансцеллюлярну проникність інтактних судин і моношару ендотеліальних клітин. Збільшення парацеллюлярної проникності відбувається за рахунок активації комплексу актин-міозин, що змінює форму ендотеліальних клітин і збільшує ширину міжклітинних контактів [44]. Трансендотеліальний транспорт збільшується в результаті об'єднання внутрішньоклітинних везикул з утворенням трансендотеліальних каналів [45]. Доведено, що саме цей VEGF забезпечує підвищену проникність судин у пухлинах [46].

Вазодилатуючий ефект VEGF показаний в експериментах на тваринах. Доведено, що VEGF стимулює вивільнення NO і дозозалежне підвищення вмісту як мРНК ендотеліальної NOSинтетази так і самого ферменту [47, 48].

Роль VEGF у запаленні пов'язана не тільки з впливом на проникність ендотеліальних клітин, але й на активацію хемотаксису і інфільтрацію тканин моноцитами, макрофагами і лімфоцитами. Тучні клітини при запаленні з одного боку продукують сам VEGF, а з іншого вивільнюють гепаринази, які вивільняють VEGF із комплексу з гепарансульфатпротеогліканом, що збільшує судинну проникність, хоча і значно слабкіше, ніж VEGF [49]. Еозинофіли експресують VEGFR1, активація яких призводить до їх дегрануляції. через взаємодію з VEGF. Активація VEGFR1 при взаємодії з PlGF запускає молекулярний каскад спрямований на реалізацію прозапальних змін за умов неангіогенезу і атеросклерозу [50].

Позасудинні ефекти реалізуються за рахунок взаємодії VEGF-A з рецепторами стовбурових гемопоетичних клітин, мегакаріоцитів, моноцитів, нейронів, клітин глії, альвеолярного епітелію і епітелію кришталика [51]. Доведено, що взаємодія VEGF-A з VEGFR2 та NRP1 чинить нейропротекторну дію, як за рахунок посиленого ангіогенезу, так і за рахунок прямої стимуляції функцій нейронів. За умов експериментальної ішемії VEGF-A підвищує ріст і виживання нейронів та їх попередників [52].

Усі члени сімейства VEGF у своїй структурі мають загальний гомологічний домен. Він представлений мотивом цистеїнового вузла що складається з 8 цистеїнових залишків. Останні беруть участь у створенні міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних бісульфідних зв'язків на одному кінці консервативного чотирьохскладчастого бетта-листу кожного мономера. З'єднання мономерів під час димеризації відбувається бік-у-бік в антипараллельному напрямі.

VEGF-A – гомодимерний глікопротеїн з молекулярною масою 34 - 42-kDa, що містить залежно від ізоформи від 110 до 206 амінокислот. Відомі 8 основних ізоформ VEGF-A, 7 з яких є результатом альтернативного сплайсингу транскриптів первинної мРНК, - VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>,

VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub> і одна - VEGF-A<sub>110</sub> – результатом протеолітичного розщеплення [49]. Ізоформи відрізняються за величиною поліпептидного ланцюга (110, 121, 145, 148, 165, 183, 189 і 206 амінокислот відповідно). У нормальних і трансформованих клітинах, що секретують VEGF-A переважно виявляється ізоформа VEGF-A<sub>165</sub>, зріла форма якої є гомодимером з молекулярною масою 45 кДа. VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> також утворюються у достатній кількості, тоді як ізоформа VEGF-A<sub>206</sub> зустрічається вкрай рідко. Різні ізоформи відрізняються між собою фізіологічними властивостями – мітогенним потенціалом, хемотаксичною здатністю, сигнальною трансдукцією та ін. Так, VEGF-A<sub>110</sub> і VEGF-A<sub>121</sub> виявляють у 100 разів менший мітогенний потенціал щодо ендотеліальних клітин, ніж VEGF-A<sub>165</sub>.

Структурні особливості ізоформ VEGF-A впливають на їх фізико-хімічні властивості. VEGF-A<sub>121</sub> повністю розчинюється після секреції у позаклітинне середовище, має слабокислотні властивості і не зв'язується з гепарином. VEGF-A<sub>165</sub> секретується з клітин, але при цьому залишається в зв'язаному стані на клітинній поверхні або в позаклітинному матриксі, є гепарин-зв'язуючим білком. Ізоформи VEGF-A<sub>189</sub> і VEGF-A<sub>206</sub> знаходяться у зв'язаному з позаклітинним матриксом стані, характеризуються вираженими основними властивостями і виявляють високу спорідненість до гепарину. Зв'язані форми VEGF-A вивільнюються під впливом гепарину, гепаринази або плазміну [53].

Ген VEGF-A знаходиться на короткому плечі 6 хромосоми 6p21.3. Як вже зазначалось, він є основою всіх ізоформ VEGF-A, а молекулярна неоднорідність пептидів пов'язана з альтернативним сплайсингом. Ген складається з 8 екзонів, що розділені 7 інтронами. 1 екзон кодує сигнальну послідовність, 2- N-термінальний кінець молекули протеїна, 3 - домен димеризації, VEGFR1-зв'язуючий домен та сайт N-глікозилювання, 4 - VEGFR2-зв'язуючий домен, 5 - сайт розщеплення плазміну, 8 - COOH-термінальний кінець. Амінокислоти, що кодуються в екзонах 1, 2, 3, 4, 5, 8 є консервативними для всіх ізоформ, за виключенням VEGF-A<sub>145</sub>. Ідентичність кожної ізоформи VEGF-A визначається варіабельним включенням екзонів 6a, 6b, 7a і 7b, які кодують гепарин-зв'язуючий домен. У VEGF-A<sub>165</sub>

відсутні залишки, які кодуються екзоном 6, в той час як VEGF-A<sub>121</sub> відсутні залишки, які кодуються екзонами 6 і 7. Наявність або відсутність цих доменів впливає на розчинність білка і його зв'язування з рецептором. Ізоформи, що містять цей домен (VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, і VEGF-A<sub>206</sub>) тісно пов'язані гепаринвмісними протеогліканами клітинної поверхні, у той час як ті, у яких відсутній цей домен вільно дифундують у клітинний матрикс.

Після синтезу, VEGF-A підлягає посттрансляційній модифікації, що полягає у глікозилюванні первинної молекули. Проте вважають, що для виявлення біологічних властивостей поліпептидна частина молекули не потребує вуглеводного компоненту. Так, рекомбінантний VEGF, експресований *Escherichia coli*, не відрізняється від білка *in vivo* за своєю біологічною активністю [54].

Аналіз промоторного регіона виявив наявність одного транскрипційного сайту, безпосередньо біля специфічного сайту зв'язування *Sp1*, а також декілька потенційних специфічних сайтів зв'язування факторів транскрипції AP-1 и AP-2.

Регуляція експресії гена VEGF-A забезпечується цілою низкою факторів. По-перше, це такі фактори середовища, як рН, тиск, концентрація кисню [55], трансформація структури клітин під дією механічних сил [56]. Одним із найважливіших з них є гіпоксія. В ендотеліальних клітинах гіпоксія-індукований білковий комплекс HIF-1, зв'язуючись з енансер послідовностями гена VEGF-A, посилює його експресію. У трофобласті HIF-1 стимулює не тільки експресію VEGF, а й експресію sVEGFR-1. Було доведено, що при преєклампсії, гіпоксична плацента виробляє VEGF і sVEGFR-1 у надлишку. Внаслідок взаємодії VEGF і sVEGFR-1, кількість вільного VEGF, здатного взаємодіяти з мембранним рецептором і виявляти ангіогенні ефекти, залишається низькою [57, 58].

Дані щодо рівня експресії генів рецепторів за умов гіпоксії отримані *in vitro* та *in vivo* відрізняються. Доведено, що у культивованих ендотеліальних клітинах гіпоксія індукує підвищення VEGFR-1-мРНК тоді як експресія VEGFR-2 залишається незмінною, або помірно знижується. Цю відмінність можна пояснити відсутністю у промоторній ділянці гена VEGFR-2 сайту зв'язування з HIF-1. Проте у дослідях *in vivo* отримані інші результати - гіпоксія підвищує експресію обох

рецепторів. Оскільки ген VEGFR-2 не має сайту зв'язування HIF в промоторній ділянці, відповідь при гіпоксії *in vivo*, можливо, можна пояснити посттранскрипційним збільшенням стабільності мРНК і стимулюючим ефектами ще невстановленого паракринного посередника, що виділяє ішемічна тканина, який відсутній в супернатанті ендотеліальних клітин. Таким чином, вчені зробили висновок, що в умовах гіпоксії посилюється експресія як VEGFR-1 так і VEGFR-2 [58].

У досліджах *in vitro* показано, що ізольоване механічне розтягнення у культурі клітин сприяє виділенню VEGF. Посилення кровотоку, зростання напруги зсуву і трансформація ендотеліальних клітин в умовах фізичного навантаження призводить як до підвищення експресії VEGF, так і збільшення кількості VEGFR [59].

Одним із можливих механізмів впливу факторів середовища може бути опосередкована через VEGF стимуляція важливих для ангиогенезу факторів, включаючи антиапоптичні білки, молекули клітинної адгезії і металлопротеїнази [60].

Друга група регуляторів експресії VEGF-A – численні фактори росту, цитокіни та інші медіатори, серед яких епідермальний фактор росту, трансформуючий фактор росту альфа (TGF-альфа), FGF-2, TGF-бета, фактор росту кератиноцитів, фактор некрозу пухлини, інтерлейкін -1 і інтерлейкін-6, інсуліноподібний фактор росту 1, фактор росту гепатоцитів, і простагландини E1 і E2 [56].

Крім того, стимулюють транскрипцію гена VEGF-A й деякі гормони. Так, естрогени та прогестини, посилюють інтенсивність експресії VEGF-A, викликають стабілізацію VEGF-мРНК, збільшуючи період напіврозпаду транскриптів. Не дивлячись на те, що 5'ділянка не містить класичних estrogen response element, проте вона містить декілька AP-1 and Sp1 sites - відомих посередників у дії естрогенів. Тестостерон також викликає збільшення VEGF-A експресії і стабілізацію мРНК. Вплив тестостерону на експресію VEGF-A було вивчено в андрогенозалежній лінії S115 ракових клітин молочної залози миші і



людської простати. не містить будь-яких або гонадотропіну. Проте, встановлено, що регуляторні елементи для зв'язування андрогену у промоторній ділянці гена VEGF відсутні і його дія моделюється через комплекс AP-1 [58].

Дія VEGF на клітини-мішені опосередкована його взаємодією з VEGFR. Існує 3 типи рецепторів VEGF — VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) та VEGFR-3(Flt-4), що належать до сімейства тирозинкіназних рецепторів. Рецептори VEGF експресуються переважно в ендотеліальних клітинах кровоносних судин, забезпечуючи регуляцію ангиогенезу, стабілізацію утворених судин, регуляцію їх проникності та дилатацію. У значно меншій кількості вони також представлені у стовбурових гемопоетичних клітинах, мегакаріоцитах, моноцитах, нейронах та пухлинних клітинах, викликаючи позасудинні ефекти VEGF [43]. Рецептори є трансмембранними білками. Позаклітинна, лігандзв'язуюча частина рецептору, складається з 7 імуноглобулінподібних доменів. Внутрішньоклітинна частина – тирозинкіназний домен – розділена на 2 ділянки короткою послідовністю (інтеркіназною вставкою), що специфічна для кожного типу рецепторів [61]. При взаємодії з лігандом відбувається гомо-або гетеродимеризації рецепторів (VEGFR1 з VEGFR1, VEGFR2 з VEGFR2 або VEGFR1 з VEGFR2) з наступною активацією їх каталітичної активності [62]. VEGFR3 у дорослому організмі експресується переважно у ендотелії лімфатичних судин. У дослідях з трансгенними мишами, показано, що у шкірі цих мишей гіперекспресія VEGF-C (одного з лігандів VEGFR3) призводила до гіперплазії лімфатичних, а не кровоносних судин. Рецепторну функцію щодо VEGF-A<sub>165</sub> і PlGF-2 можуть виявляти нейропілін-1 та нейропілін-2.

Експресія нейропілінів виявлена у нейронах, ендотеліоцитах ембріональної кровоносної системи, мезенхімальних клітинах, що оточують кровоносні судини, клітинах ендокарду ембріонального серця. У дослідях на нокаутів за геном нейропіліну-1 мишах смерть ембріону наставала у зв'язку з порушеннями у формування серцево-судинної системи. Однак, підвищена експресія нейропіліну-

І також призводить до смерті у зв'язку з порушеннями у нервовій та серцево-судинній системах.

Слід зауважити, що недивлячись на те, що VEGFR-2 має нижчу афінність до VEGF-A, основні судинні та позасудинні ефекти VEGF-A пов'язані саме з його взаємодією VEGFR2 [63]. Наслідками активації VEGFR2 є посилення проліферації, міграції та диференціації ендотеліальних клітин, підвищення судинної проникності, мобілізація попередикв ендотеліальних клітин із кісткового мозку [64]. Лігандами для нього можуть бути також VEGF-C, VEGF-D і VEGF-E.

Роль VEGFR-1 в функції ендотеліальних клітин менш зрозміла. VEGFR-1 має набагато більш слабку активність кінази і не може генерувати мітогенетичні відгук в ендотеліальних клітинах при стимуляції VEGF, хоча рецептор і має найвищу афінність до VEGF-A. Показано, що VEGFR-1 модулює розподіл ендотеліальних клітин на ранніх стадіях розвитку судин з четвертого по п'ятий день диференціювання ендотеліальних клітин, як раз перед формуванням перших примітивних кровоносних судин. Ембріони і диференційовані ендотеліальні клітини, позбавлені VEGFR-1 (VEGFR-1-/-) показують збільшення васкуляризації і кількості ендотеліальних клітин, що супроводжується збільшенням індексу мітозу ендотеліальних клітин. Kearney і ін. [65] припустив, що VEGFR-1 модулює ендотеліальний клітинний цикл шляхом впливу на один або кілька молекулярних сигнальних шляхів. Потенційно, VEGFR-1 може негативно модулювати патологічну васкуляризації (гальмувати) і таким чином притупляти (зупиняти) проангіогенних ефекти VEGFR-2, але потрібне подальше дослідження. VEGFR-1 також має важливе значення в міграції клітин. Зв'язування VEGF-A<sub>165</sub> з VEGFR-1 індукує спрямовану міграцію фагоцитів через моношар клітин ендотелію, а також їх активацію, на основі експресії тканинного фактора прокоагулянтної активності. Взаємодія між VEGF-A<sub>165</sub> and VEGFR-1 крім того індукує хемотаксис в поліморфноядерних клітинах. Важливо відзначити, що моноцити і поліморфноядерні клітини експресують тільки ген VEGFR-1 і не VEGFR-2.

Основним нейтралізатором ефектів VEGF є sVEGFR1. Оскільки цей рецептор знаходиться в розчинній формі і не пов'язаний з клітинною мембраною, його взаємодія з лігандом не призводить до розвитку каскаду внутрішньоклітинних реакцій [43]. Запобігаючи зв'язуванню VEGF з VEGFR2, sVEGFR1 сприяє зменшенню ангіогенеза, зниженню судинної проникності і зменшенню запалення.

## **2 АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ rs1044498-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ENPP1 ІЗ РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ**

У дослідженні використали венозну кров 317 пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу (51,1% жінок і 48,9% чоловіків, середній вік  $64,9 \pm 8,2$  років), контрольну групу склали 302 людини (45,7% жінок і 54,3% чоловіків, середній вік  $65,1 \pm 14,5$  років). Діагностика цукрового діабету у обстежених пацієнтів проводилась на підставі анамнестичних даних, клінічних та біохімічних методів досліджень (клінічний аналіз крові і сечі, визначення глюкози крові, глікемічного профілю і глікозильованого гемоглобіна) відповідно до рекомендацій експертів ВООЗ. У дослідження не включалися пацієнт з гострими або хронічними запальними процесами в стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями, вираженою нирковою та печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмою або хірургічними втручаннями, а також особи, які отримували препарати, які можуть потенціально впливати на рівень глюкози крові.

Дослідження проводилося із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000) і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09. 2009 г. Усі пацієнти перед забором венозної крові на генетичний аналіз підписали інформовану згоду.

Для визначення генотипів пацієнтів венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвої сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянту («Sarstedt», Німеччина) і зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія).

Ділянка гена, який містив K121Q-сайт, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (forward) 5'CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG3' і зворотнього (reverse) 5'GACGCTGGAAGATACCAGGCTG3' («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 Таq-полімерази («Thermo Scientific», США). Обсяг суміші доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація складалася з 35 циклів: 1 цикл - 94 °С (4 хв), з 2 по 34 цикл - денатурація - 94 °С (50 с), гібридизація праймерів - 64,5 °С (45 с) і елонгація - 72 °С (1 хв), 35 цикл - 72 °С (5 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С протягом 18 годин з 5 ОД рестриктази Eco47I (AvaII) («Thermo Scientific», США) в буфері R наступного складу: 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 43213-й позиції гена ENPP1 знаходився цитозин, ампліфікат, який складався з 238 пар основ, розщеплювався рестриктазою Eco47I на два фрагмента – 148 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін сайт рестрикції для Eco47I був відсутній, і в суміші виявлявся один фрагмент розміром 238 пар основ.

Ампліфікати вивченого фрагмента 4-го екзона гена ENPP1 розділяли в 2,5% агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Відповідність розподілу генотипів рівноваги Харді-Вайнберга перевіряли, користуючись Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Основна частина статистичного аналізу виконана з використанням програми SPSS-17. Для порівняння розподілу генотипів у досліджуваній та контрольній групах застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку ЦД2 в залежності від наявності у пацієнта певного генотипу за допомогою бінарної логістичної регресії

розраховували відношення шансів (OR) і 95% довірчий інтервал (CI) для основних моделей успадкування. Після цього була використана мультиваріабельна логістична регресія, яка дозволила дослідити асоціацію генотипів з розвитком ЦД2 в умовах поправки на інші наявні у пацієнта фактори ризику (стать, вік, ІМТ, артеріальна гіпертензія та звичка палити). Всі тести були двосторонніми, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

Характеристика пацієнтів із ЦД2 та представників групи контролю представлена у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Загальна характеристика пацієнтів груп порівняння

Параметр	ЦД-2 (n = 317)	Контроль (n = 302)	P
Вік, років	64,9 ± 8,2	65,1 ± 14,5	0,898
Сать, жінки/чоловіки	162/155	138/164	0,178
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	29,4 ± 4,7	27,5 ± 4,9	<0,001
АТ сис., мм рт.ст.	147,5 ± 19,9	141,9 ± 23,2	0,001
АТ діас., мм рт.ст.	89,2 ± 10,5	84,1 ± 10,7	<0,001
Глюкоза натщк, ммоль/л	9,41 ± 3,1	5,25 ± 0,8	<0,001
HbA1c, %	8,48 ± 2,6		
Загальний холестерол, ммоль/л	5,23 ± 1,37	4,89 ± 1,81	0,008
ХС-ЛПВЩ, ммоль/л	0,98 ± 0,29	1,04 ± 0,39	0,029
ХС-ЛПНЩ, ммоль/л	3,35 ± 1,32	3,09 ± 1,51	0,022
ХС-ЛПДНЩ, ммоль/л	0,75 ± 0,36	0,71 ± 0,42	0,203
Тригліцериди, ммоль/л	1,82 ± 1,21	1,64 ± 1,08	0,052
ІМТ > 25 кг/м <sup>2</sup> , n (%)	263 (83,0)	209 (69,2)	<0,001
Ожиріння, n (%)	126 (39,7)	79 (26,2)	<0,001
Курці, n (%)	76 (24,0)	81 (26,8)	0,416
Артеріальна гіпертензія, n (%)	239 (75,4)	145 (48,0)	<0,001

Примітка. n - кількість пацієнтів, ІМТ – індекс маси тіла, АТ сист. – систолічний артеріальний тиск, АТ діас. – діастолічний артеріальний тиск, HbA1c – глікозильований гемоглобін, ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності, ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності, ЛПДНЩ – ліпопротеїни дуже низької щільності. Порівняння категоріальних змінних реалізовано з використанням  $\chi^2$ -тесту, безперервних змінних – t-тесту.

Генотипування пацієнтів в групах порівняння по K121Q поліморфізму гена ENPP1 дозволило встановити частоту генотипів і алелей, з якою вони зустрічаються в українській популяції (табл. 2.2).

У групі пацієнтів з ЦД2 співвідношення гомозигот за основним алелем (K/K), гетерозигот (K/Q) і гомозигот по мінорному алелю (Q/Q) склало 188 (59,3%), 108 (34,1%) і 21 (6,6%), а у контролі 205 (67,9%), 86 (28,5%) і 11 (3,6%) відповідно, що мало статистичну значимість  $P=0,05$ . Частота основного (K) та мінорного (Q) алелей склала серед хворих 76,3% до 23,7% серед здорових - 82,1% до 17,9%.

Таблиця 2.2 – Розподіл алелей та генотипів по K121Q-поліморфізму гена ENPP1 в групах порівняння

Генотип	ЦД2 (n = 317)		Контроль (n = 302)		P <sub>HWE</sub>	P
	N	%	N	%		
K/K	188	59,3	205	67,9		0,05
K/Q	108	34,1	86	28,5		
Q/Q	21	6,6	11	3,6		
Алель						
K	484	76,3	496	82,1	0,611	0,012
Q	150	23,7	108	17,9		

Відомо, що з розвитком ЦД2 пов'язані дві групи факторів ризику. До першої належать ті, що не модифікуються – це спадкова схильність, вік, стать, етнічна приналежність, до другої – ті, на які можна вплинути у процесі життя, тобто модифіковані: підвищений індекс маси тіла, ожиріння, куріння, супутня артеріальна гіпертензія (АГ) та ін. У таблиці 2.3 наведені результати розподілу генотипів по K121Q поліморфізму гена ENPP1 серед представників дослідної та контрольної груп після їх поділу на когорти, утворені у залежності від таких факторів ризику ЦД2, як підвищений ІМТ, ожиріння, куріння і АГ в анамнезі.

Таблиця 2.3 – Розподіл генотипів по K121Q-поліморфізму гена ENPP1 у пацієнтів з різними факторами ризику ЦД-2

Група	n	Генотип, n (%)			P
		KK	KQ	QQ	
ІМТ $\geq$ 25 кг/м <sup>2</sup>					
ЦД-2	263	152 (57,8)	91 (34,6)	20 (7,6)	0,072
Контроль	209	137 (65,6)	65 (31,1)	7 (3,3)	
Ожиріння					
ЦД-2	126	62 (49,2)	47 (37,3)	17 (13,5)	0,078
Контроль	79	49 (62,0)	26 (32,9)	4 (5,1)	
Паління					
ЦД-2	76	43 (56,6)	29 (38,2)	4 (5,3)	0,426
Контроль	81	54 (66,7)	24 (29,6)	3 (3,7)	
АГ					
ЦД-2	239	141 (59,0)	81 (33,9)	17 (7,1)	0,333
Контроль	145	96 (66,2)	42 (29,0)	7 (4,8)	

Примітка. n – кількість пацієнтів

Серед осіб з ІМТ  $\geq$  25 кг/м<sup>2</sup> розподіл генотипів К/К, К/Q, Q/Q у пацієнтів з ЦД2 становило – 152 (57,8%), 91 (34,6%), 20 (7, 6%), а в осіб без ЦД-2 – 137 (65,6%), 65 (31,1%), 7 (3,3%). Показник P, розрахований по  $\chi^2$ -критерію Пірсона, дорівнює 0,072 наближався до рівня статистичної значимості, проте не перетинав її. Подібні результати отримані у пацієнтів з ожирінням (P = 0,078). У підгрупах, утворених за наявності звички курити і супутньої АГ достовірної різниці у частотах генотипів (К/К, К/Q і Q/Q) між пацієнтами з ЦД2 і контролем виявлено не було (P = 0,426, P = 0,333 відповідно).

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів по K121Q поліморфізму гена ENPP1 з розвитком ЦД2 у рамках різних моделей успадкування наведені у табл. 2.4.

Методом бінарної логістичної регресії виявлений зв'язок у рамках домінантної моделі успадкування (KQ/QQ vs K/K) ( $P_n = 0,027$ ). Розрахунок відносного ризику в рамках представленої моделі показав, що у носіїв мінорного



аллеля ризик ЦД-2 в 1,4 (95% CI = 1,043-2,016) рази вище, ніж у гомозигот за основним алелем. Після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ, ожиріння і наявність артеріальної гіпертензії достовірність цих результатів зберігалася ( $P_{\text{попр}} = 0,026$ ) ( $OR_{\text{попр}} = 1,455$ ; 95% CI = 1,046-2,024).

Таблиця 2.4 – Аналіз асоціації генотипів по K121Q-поліморфізму гена ENPP1 з ризиком ЦД2 у пацієнтів різних підгруп

Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)
Загальна група				
K/Q vs K/K	0,134	1,298 (0,923–1,826)	0,231	1,249 (0,868–1,796)
KQ/QQ vs K/K	0,027	1,450 (1,043–2,016)	0,026	1,455 (1,046–2,024)
Q/Q vs K/K	0,099	1,877 (0,889–3,962)	0,479	1,337 (0,598–2,989)
ІМТ $\geq 25$ кг/м <sup>2</sup>				
K/Q vs K/K	0,422	1,172 (0,795–1,727)	0,359	1,214 (0,802–1,839)
KQ/QQ vs K/K	0,086	1,390 (0,954–2,024)	0,146	1,350 (0,901–2,022)
Q/Q vs K/K	0,054	2,375 (0,984–5,730)	0,048	1,802 (1,063–3,653)
Ожиріння				
K/Q vs K/K	0,523	1,213 (0,671–2,192)	0,366	1,335 (0,713–2,500)
KQ/QQ vs K/K	0,074	1,686 (0,951–2,991)	0,074	1,733 (0,947–3,172)
Q/Q vs K/K	0,062	2,924 (0,946–9,036)	0,129	2,472 (0,769–7,942)
Паління				
K/Q vs K/K	0,260	1,465 (0,754–2,848)	0,235	1,559 (0,749–3,242)
KQ/QQ vs K/K	0,195	1,535 (0,803–2,933)	0,273	1,486 (0,732–3,018)
Q/Q vs K/K	0,638	1,444 (0,313–6,676)	0,886	0885 (0,167–4,704)
АГ				
K/Q vs K/K	0,316	1,257 (0,803–1,967)	0,437	1,200 (0,758–1,902)
KQ/QQ vs K/K	0,159	1,362 (0,886–2,093)	0,384	1,219 (0,781–1,902)
Q/Q vs K/K	0,373	1,510 (0,610–3,734)	0,807	1,125 (0,437–2,901)

Примітка. 95% CI – 95% довірчий інтервал;  $R_{\text{спост}}$  – спостережуване значення P (без поправки на коваріати);  $OR_{\text{спост}}$  – спостережуване відношення шансів;  $R_{\text{попр}}$  – значення P після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку курити;  $OR_{\text{попр}}$  – відношення шансів після поправки на коваріати.

Було з'ясовано, що досліджуваний поліморфний сайт не впливає на ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу в підгрупах з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup>, ожирінням,

курінням, АГ якщо проводити аналіз без урахування інших факторів ризику ЦД2 ( $P > 0,05$ ). Однак, після поправки на інші чинники ризику діабету у підгрупі пацієнтів з  $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$  аналіз у рамках рецесивної моделі успадкування (Q/Q vs K/K) показав, що в осіб з Q/Q-генотипом ризик розвитку ЦД2 зростає в 1,8 рази ( $CI = 1,063-3,653$ ;  $P_{\text{попр}} = 0,048$ ). Результати аналізу в рамках інших моделей не були значимими.

Отримані нами результати підтверджують наявні дані про асоціацію K121Q-поліморфізму з ризиком розвитку ЦД-2. Проведений Tang S. et al. мета-аналіз, заснований на результатах дослідження 40 наукових робіт у різних популяціях світу, показав, що для загальної групи пацієнтів був встановлений достовірний зв'язок між K121Q поліморфізмом гена ENPP1 і ЦД-2 при порівнянні носіїв Q-алеля з K-алелем ( $OR = 1,29$ ,  $95\% CI = 1,16-1,44$ ,  $P = 0,001$ ) [67].

З огляду на той факт, що порівнювалися пацієнти різної етнічної приналежності, дана асоціація була підтверджена окремо для пацієнтів європейського і азіатського походження ( $OR = 1,20$ ,  $95\% CI = 1,08-1,33$  і  $OR = 1,47$ ,  $95\% CI = 1,15-1,89$ , відповідно). Таким чином, Q-алель може сприяти розвитку цукрового діабету 2-го типу у європейців і азіатів. Для домінантної моделі (KQ/QQ vs KK) отримані аналогічні результати ( $OR = 1,31$ ,  $95\% CI = 1,16-1,48$ ,  $P < 0,001$ ). При поправці на коваріати достовірність результатів зберігалася ( $95\% CI = 1,19-1,56$ ,  $P < 0,001$ ). Що стосується асоціації K121Q-поліморфізму гена ENPP1 з розвитком ЦД-2 у пацієнтів з різною величиною ІМТ, то деякі автори отримали наступні результати. Згідно N. Matsuoka et al. K121Q поліморфізм гена ENPP1 не асоційований з підвищеним ІМТ в європейській і афроамериканській популяціях [68]. Так, розподіл генотипів (K/K, K/Q і Q/Q) у європейців, які не страждають на ожиріння, склало: 59,2, 36,1 і 4,7%. Серед тих, хто мав  $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$ , частота генотипів була 70,2, 24,6 і 5,2% відповідно ( $P=0,16$ ). У афроамериканській популяції серед тих, хто мав нормальну вагу, пацієнтів з K/K, K/Q і Q/Q-генотипами було 5,9, 32,2 і 61,8%; серед тих, хто страждав ожирінням, різні варіанти генотипів становили: 9,5, 39,6 і 50,9% відповідно ( $P = 0,30$ ). Однак автори відзначили, що в осіб, що мали генотип K/K, ІМТ був вище, ніж у носіїв

мінорного Q-алеля ( $P < 0,001$ ). У своїх дослідженнях Hamaguchi K. et al. у домініканській ( $P > 0,05$ ) [69], Rasmussen S. K. et al. у данській ( $P > 0,05$ ) [70], а González-Sánchez J. L. et al. в іспанській популяціях ( $P > 0,05$ ) [71] не встановили асоціації K121Q-поліморфізму гена ENPP1 з ожирінням у хворих на ЦД-2, але діапазон величини ІМТ у цих дослідженнях був між 24 і 28 кг/м<sup>2</sup>.

Порівняння отриманих нами даних при вивченні механізмів розвитку ЦД2 у поєднанні з АГ та їх асоціація з K121Q-поліморфізмом гена ENPP1 з результатами досліджень в інших популяціях виявив наступне. J. R. Sowers et al. в своїх роботах показали, що у хворих на цукровий діабет підвищення артеріального тиску зустрічається значно частіше, ніж у загальній популяції [72]. Як було показано раніше в дослідженні MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial), при однаковій вираженості різних факторів ризику на тлі ЦД їх «шкідливість» зростає в 3-4 рази [73, 74]. D. Zhou et al. в своїх роботах відзначили вплив на розвиток ЦД2 і АГ таких генів-кандидатів: ESR, KCNJ11, PPARG, TCF7L2, ACE, CAPN 10 і ENPP1 [75]. У проведених нами дослідженнях серед жителів України не було виявлено асоціацію між K121Q поліморфізмом гена ENPP1 і АГ у пацієнтів з ЦД2. Подібні дані отримали R. Vasudevan et al. в своїх дослідженнях на малайзійській популяції [76]. У роботі S. Vassì et al. при дослідженні пацієнтів Сицилії з інсулінорезистентністю, які не мали ожиріння, встановили, що значення АТ у осіб з різними генотипами по K121Q поліморфізмом гена ENPP1 достовірно не відрізнялися [77].

### 3 ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ rs997509-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ENPP1 ІЗ НАСТАННЯМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

Ділянку гена, який містив rs997509-сайт, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (forward) 5'CTACCAAATATGGGCCACTGAT3' та зворотного (reverse) 5'TGGACCAAGTGTTACCACAAA3' («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 та 0,75 ОД Taq-полімерази («Thermo Scientific», США). Обсяг суміші доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента 1-го інтрона, що містить C43822T-сайт, складалася з 35 циклів: 1 цикл – 94 °C (4 хв), з 2 по 34 цикл – денатурація – 94 °C (50 с), гібридизація праймерів – 64 °C (40 с) і елонгація – 72 °C (1 хв), 35 цикл – 72 °C (5 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °C протягом 16 годин з 2 ОД рестриктази SsiI (AciI) («Thermo Scientific», США) в буфері О наступного складу: 50 mM трис-НСl (рН 7,5), 10 mM хлориду магнію, 100 mM хлориду натрію і 0,1 мг / мл альбуміну. Результати рестрикційного аналізу оцінювали наступним чином: якщо в 43822-й позиції гена ENPP1 знаходився цитозин, ампліфіката (475 пар основ), розщеплюється рестриктазою SsiI на два фрагмента – 223 і 252 пар основ; у разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для SsiI був відсутній, і в суміші виявлявся один фрагмент розміром 475 пар основ.

Ампліфікати досліджуваного фрагмента 10-го інтрона гена ENPP1 після проведення рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз виконаний з використанням програми SPSS-17. Безперервні дані наведені у вигляді середнього значення  $\pm$  SD (стандартні відхилення), номінальні дані представлені у вигляді кількісних та процентних значень. Перевірку безперервних даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Визначення достовірності відмінностей середніх значень між двома вибірками проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Відповідність розподілу генотипів рівноваги Харді–Вайнберга перевіряли користуючись Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Для порівняння розподілу генотипів у досліджуваній і контрольній групах застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку ЦД2 у носіїв гетерозиготного С/Т-генотипу розраховували відношення шансів (OR) і 95% довірчий інтервал (CI). Такі фактори ризику як вік, стать, ІМТ, куріння, наявність ожиріння і артеріальної гіпертензії були використані в якості коваріат при реалізації мультіваріабельного логістичного регресійного аналізу. Всі тести були двосторонніми, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

Генотипування пацієнтів з ЦД2 і осіб контрольної групи дало можливість встановити частоту генотипів і алелей в групах порівняння (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Розподіл алелей та генотипів по rs997509-поліморфізму гена ENPP1 у групах порівняння

Генотип	ЦД-2 (n = 317)		Контроль (n = 302)		$P_{HWE}$	P
	n	%	N	%		
CC	282	89,0	285	94,4		0,015
CT	35	11,0	17	5,6		
TT	0	0,0	0	0,0		
Алель						
С	599	94,5	587	97,2	0.972	0,018
Т	35	5,5	17	2,8		

Так, у дослідній групі співвідношення гомозигот за основним алелем (C/C), гетерозигот (C/T) і гомозигот по мінорному алелю (T/T) склало 282 (89,0 %), 35 (11,0 %) і 0 (0 %), тоді як у контролі 285 (94,4 %), 17 (5,65 %) і 0 (0%) відповідно. Частота основного (C) та мінорного (T) алелей склала серед хворих 94,5 % до 5,5 %, серед здорових – 97,2 % до 2,8 %.

За результатами, отриманими Bochenski J. і співавт. розподіл генотипів C/C, C/T, T/T серед жителів Польщі склало 193 (93,2 %), 14 (6,8 %) і 0 (0 %) [78]. У дослідженні Santoro N. і колег наведені дані про співвідношення генотипів в італійській популяції: C/C – 356 (89,0 %), C/T – 40 (10,0 %), T/T – 4 (1,0 %) [79]. Порівняння отриманих нами даних з результатами досліджень в інших популяціях виявило відсутність відмінностей у розподілі генотипів між українською та польською популяціями ( $P = 0,660$ ), а також української та італійської популяціями ( $P = 0,110$ ).

У роботі Yako Y.Y. і співавт. [80] співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот по мінорному алелю у жителів Південної Африки було таким – 254 (77,4 %), 70 (21,4 %), 4 (1,2 %), що достовірно відрізняється від такого в українській ( $P = 0,0001$ ) та інших європейських популяціях. Отримані дані дають можливість зробити висновок про те, що відмінності у розподілі генотипів по rs997509-поліморфізму є не стільки популяційних, скільки расової. Хоча, розширення досліджень в даному напрямку і отримання результатів для більшої кількості популяцій можуть змінити це твердження.

Як відомо, ожиріння є однією з основних причин розвитку цукрового діабету. За даними ВООЗ надлишкова маса тіла – причина цукрового діабету в 44% випадків. У результаті аналізу, отриманих нами даних, показано, що серед осіб з ІМТ  $< 25 \text{ кг/м}^2$  співвідношення генотипів у дослідній та контрольній групах достовірно не відрізняється ( $P = 0,731$ ) (табл. 3.2).

Серед осіб з ІМТ  $\geq 25 \text{ кг/м}^2$  розподіл генотипів C/C, C/T, T/T у пацієнтів з ЦД2 становило – 231 (87,8%), 32 (12,2%), 0 (0), а в осіб без ЦД-2 – 196 (93,8 %), 13 (6,2 %), 0 (0 %). Показник  $P$ , розрахований по  $\chi^2$ -критерію Пірсона, дорівнює

0,029, що свідчить про існування достовірної різниці в розподілі генотипів по rs997509-поліморфізму серед осіб з підвищеним значенням індексу маси тіла, які страждають на цукровий діабет і здорових людей. Така ж тенденція простежується і у пацієнтів з ожирінням. Співвідношення генотипів C/C, C/T, T/T по rs997509-поліморфізму гена ENPP1 у групах порівняння достовірно відрізнялося ( $P = 0,024$ ).

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів по rs997509-поліморфний сайту гена ENPP1 с розвитком ЦД2 наведені у таблиці 3.3.

Таблиця 3.2 – Розподіл генотипів по rs997509-поліморфізму гена ENPP1 у пацієнтів з надмірною масою тіла та ожирінням

Група	n	Генотип, n (%)			P
		C/C	C/T	T/T	
ІМТ < 25 кг/м <sup>2</sup>					
ЦД2	54	51 (94,4)	3 (5,6)	0 (0)	0,731
Контроль	93	89 (95,7)	4 (4,3)	0 (0)	
ІМТ ≥ 25 кг/м <sup>2</sup>					
ЦД2	263	231 (87,8)	32 (12,2)	0 (0)	0,029
Контроль	209	196 (93,8)	13 (6,2)	0 (0)	
Без ожиріння					
ЦД2	191	180 (94,2)	11 (5,8)	0 (0)	0,709
Контроль	223	212 (95,1)	11 (4,9)	0 (0)	
Ожиріння					
ЦД2	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

Метод бінарної логістичної регресії виявив достовірний зв'язок вивченого поліморфізму з ЦД2 як у групі у цілому ( $P = 0,017$ ), так і в підгрупах з  $ІМТ \geq 25$  кг/м<sup>2</sup> ( $P = 0,032$ ) і з ожирінням ( $P = 0,029$ ). Після поправки на вік, стать, ІМТ, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії, звичку курити цей висновок був підтверджений. Показано, що у носіїв мінорного аллеля ризик розвитку ЦД2

достовірно вище, ніж у гомозигот за основним алелем (OR = 2,086; P = 0,027). Ризик зростає у осіб з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> (OR = 2,223; P = 0,031) і пацієнтів з ожирінням (OR = 3,230; P = 0,023).

Таблиця 3.3 – Аналіз асоціації генотипів по rs997509-поліморфізму гена ENPP1 з ризиком ЦД2 у пацієнтів різних підгруп

	Модель	P <sub>спост</sub>	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	P <sub>попр</sub>	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
Загальна група					
	CT vs CC	0,017	2,081 (1,139–3,800)	0,027	2,086 (1,089–3,996)
ІМТ					
ІМТ < 25 кг/м <sup>2</sup>	CT vs CC	0,731	1,309 (0,282–6,081)	0,632	1,467 (0,306–7,037)
ІМТ $\geq 25$ кг/м <sup>2</sup>	CT vs CC	0,032	2,089 (1,066–4,090)	0,031	2,223 (1,076–4,594)
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<sub>спост</sub> - спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR<sub>спост</sub> – спостережуване відношення шансів; P<sub>попр</sub> - значення P після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії та звичку курити; OR<sub>попр</sub> – відношення шансів після поправки на коваріати.

Отримані нами результати підтверджують наявні дані про асоціацію rs997509-поліморфізму з ризиком ЦД2 і його важливу роль у розвитку ожиріння. Так, Vochenski J. і співавт. показали, що rs997509-поліморфізм 1-го інтрона гена ENPP1 асоційований з високим ризиком ЦД2 у осіб з ожирінням у польській популяції [80]. Santoro N. і співавт. у своїй роботі про вплив rs997509-поліморфізму ENPP1 на розвиток метаболічного синдрому і порушення толерантності до глюкози при ожирінні [79] зафіксували у дітей з ожирінням, які є носієм мінорного (T) алеля по rs997509-поліморфізму, більш високий рівень інсуліну в крові, індекс інсулінорезистентності (НОМА – Homeostasis Model Assessment) і більш низькі показники індексу чутливості до інсуліну (WBISI - whole body insulin sensitivity index). Автори зробили висновок про те, що T-аллель по rs997509-поліморфізму може бути асоційований з розвитком метаболічного синдрому та інсулінорезистентності у дітей з ожирінням. У дослідженні групи



Matsha T. виявлена значна різниця у співвідношенні T-алеля rs997509 між пацієнтами з ожирінням і контрольною групою ( $p = 0,010$ ) у південноафриканській популяції. Автори зробили висновок про те, що наявність T-алеля по rs997509-поліморфізму підвищує ризик ожиріння у його носіїв ( $p = 0,024$ ). Yako Y. і співавт. довели зв'язок мінорного T-алеля з ризиком ЦД2 у жителів Південної Африки [78].

З огляду на обставину, що у більшості досліджуваних популяцій поліморфний сайт rs997509 гена ENPP1 знаходиться у нерівноважному зчепленні з іншим добре вивченим локусом rs1044498 цього гена [78, 80], а також той факт, що гаплотипний аналіз є більш ефективним у контексті пошуку генетичних предикторів, ніж аналіз однонуклеотидних поліморфізмів, наші подальші дослідження будуть спрямовані на генотипування пацієнтів представлених у даній роботі груп по поліморфізму rs1044498 з метою подальшого аналізу зв'язку гаплотипов гена ENPP1 з розвитком ЦД2 у осіб з різними факторами його ризику.

#### 4 РОЛЬ ПОЛІМОРФНОГО САЙТУ rs997509 ГЕНА ENPP1 У РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ У ПАЦІЄНТІВ З ОЖИРІННЯМ

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 [81]. 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 (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Розподіл генотипів за rs997509 поліморфізмом гена ENPP1 у пацієнтів з ожирінням

Група	n	Генотип, n (%)			P
		C/C	C/T	T/T	
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 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 C/C, C/T і T/T 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  $\chi^2$ -критерію Пірсона дорівнював 0,024, що свідчить про існування достовірної різниці в розподілі генотипів за rs997509 поліморфізмом серед осіб з ожирінням.

У таблиці 4.2 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 підтверджені 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 [82]. 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 ( $p = 0,024$ ) [83]. Яко Y. et al. довели зв'язок мінорного Т алеля з ризиком розвитку ЦД 2-го типу у жителів Південної Африки [84]. 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 [85].

Таблиця 4.2 – Аналіз асоціації генотипів за rs997509 поліморфізмом гена *ENPP1* з ризиком ЦД 2-го типу у пацієнтів з ожирінням

	Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (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)
Ожиріння					
Без ожиріння	СТ vs CC	0,709	1,178 (0,499–2,781)	0,473	1,396 (0,562–3,467)
Ожиріння	СТ vs CC	0,029	2,863 (1,114–7,356)	0,023	3,230 (1,175–8,881)

Примітка. 95 % CI – 95 % довірчий інтервал;  $P_{\text{спост}}$  – спостережуване значення P (без поправки на коваріати);  $OR_{\text{спост}}$  – спостережуване відношення шансів;  $P_{\text{попр}}$  – значення P після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку курити;  $OR_{\text{попр}}$  – відношення шансів після поправки на коваріати.

## 5 ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ VEGFA ТА BGLAP ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

У дослідженні використано венозну кров 317 пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу (51,1% жінок і 48,9% чоловіків, середній вік  $64,9 \pm 8,2$  років), контрольну групу склали 302 особи (45,7% жінок і 54,3% чоловіків, середній вік  $65,1 \pm 14,5$  років). Діагностика цукрового діабету у обстежених пацієнтів проводилась на підставі анамнестичних даних, клінічних та біохімічних методів досліджень (клінічний аналіз крові і сечі, визначення глюкози крові, глікемічного профілю і глікозильованого гемоглобіна) відповідно до рекомендацій експертів ВООЗ. У дослідження не включалися пацієнт з гострими або хронічними запальними процесами в стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями, вираженою нирковою та печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмою або хірургічними втручаннями, а також особи, які отримували препарати, які можуть потенціально впливати на рівень глюкози крові.

Забір зразків крові для генотипування проводили в стерильних умовах в S-моновети об'ємом 2,7 мл (Sarstedt, Німеччина), що містять калієву сіль EDTA в якості антикоагулянту. Зразки заморожували і зберігали при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

ДНК для генотипування виділяли з периферичних лейкоцитів за допомогою комерційно доступних комплектів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно до протоколу виробника. Для визначення поліморфізму C936T (rs3025039) гена VEGFA була проведена полімеразна ланцюгова реакція з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Ділянку гена VEGFA, що містить потрібний поліморфний локус, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) - 5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' і зворотній (antisense) - 5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG-3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-

100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеозидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 1 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), обсяг доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (ThermoFisher Scientific, США). Ампліфікація складалася з 33 циклів: денатурація - 94 ° С (50 с), гібридизація - 59 ° С (60 с) і елонгація - 72 ° С (60 с). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукт ампліфікації (208 п.н.) інкубували при 37°C протягом 18 год з 5 ОД рестриктази *Hin1II* (*NlaIII*) (ThermoFisher Scientific, США). Якщо в + 936-м положенні 3'UTR гена *VEGFA* знаходився цитозин, ендонуклеаза не знаходила сайту рестрикції і вихідний фрагмент 208 п.н. залишався без змін. У разі заміни цитозину на тимін рестриктаза *Hin1II* розщеплювала ампліфіката на два фрагменти - 122 п.н. і 86 п.н. Фрагменти рестрикції розділяли за допомогою електрофорезу в 2,0% агарозному гелі, що містить бромистий етидій.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку безперервних даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Для порівняння розподілу генотипів в експериментальній і контрольній групах а також відповідності цього розподілу рівноваги Харді-Вайнберга застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку ЦД2 розраховували відношення шансів (OR) і 95% довірчий інтервал (CI) для різних моделей успадкування. Такі фактори ризику ЦД2, як вік, стать, ІМТ, куріння, наявність ожиріння та артеріальної гіпертензії (АГ) були застосовані в якості коваріат під час мультіваріабельного логістичного регресійного аналізу. Всі тести були двосторонніми, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

Клінічна характеристика 317 пацієнтів з ЦД2 і 302 осіб групи контролю представлена в таблиці 2.1

У таблиці 5.1 представлені частоти основного (С) і мінорного (Т) алелей і наведені розподіл генотипів за С936Т-поліморфним сайтом 3'UTR гена *VEGFA* у хворих з ЦД2 і представників групи контролю. Показано, що частоти зазначених

генотипів в контрольній і дослідній групах знаходилися відповідно до рівноваги Харді-Вайнберга ( $P > 0,05$ ). Порівняння частот трьох можливих варіантів генотипів, утворених поліморфним локусом С936Т гена VEGFA, між пацієнтами з ЦД2 і представниками контрольної групи методом  $\chi^2$ -критерій Пірсона показало відсутність значущої різниці ( $P = 0,413$ ).

Таблиця 5.1 – Частота алелів і генотипів за С936Т-локусом гена VEGFA у групах порівняння

	ЦД2 (n = 317)	Контроль (n = 302)
Гомозиготи С/С, n (%)	150 (47,4)	151 (50,0)
Гетерозиготи С/Т, n (%)	132 (41,6)	131 (43,5)
Гомозиготи Т/Т, n (%)	35 (11,0)	20 (6,5)
С-алель	0,68	0,72
Т-алель	0,32	0,28
$\chi^2$	0,27	0,69
P	> 0,05	> 0,05

Примітка. n – кількість пацієнтів; ЦД2 – цукровий діабет 2 типу;  $\chi^2$  и P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді-Вайнберга

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів за С936Т-поліморфізмом гена VEGFA із розвитком ЦД2 в рамках домінантної, рецесивної, наддомінантної і адитивної моделей успадкування показані в таблиці 5.2. Застосування бінарної логістичної регресії не виявило достовірного зв'язку досліджуваного локусу із розвитком ЦД2 в рамках жодної з моделей ( $P > 0,05$ ). Після цього була використана мультіваріабельна логістична регресія. Однак, і після поправки на вік, стать, ІМТ, наявність ожиріння, АГ і звичку курити значущою асоціації різних генотипів за поліморфними локусом 3'UTR гена VEGFA із настанням ЦД2 встановити не вдалося ( $P > 0,05$ ).

Однонуклеотидний поліморфізм rs3025039 є заміною цитозину на тимін в +936 положенні 3'-нетрансльовані області гена VEGFA. Така точкова заміна може запобігати приєднанню транскрипційного фактора AP-4 (transcription factor activating enhancer binding protein 4), що, в свою чергу, може впливати на якісні і

кількісні характеристики майбутньої мРНК [37]. У відповідність до цього, на сьогодні показано зв'язок 936Т-алеля гена VEGFA зі зниженням рівня його експресії та плазмової концентрації його білка [43].

Таблиця 5.2 – Аналіз зв'язку С936Т-поліморфізму гена VEGFA із ЦД2 в рамках різних моделей успадкування

Модель	P <sub>спост</sub>	OR <sub>спост</sub> (95% CI)	P <sub>попр</sub>	OR <sub>попр</sub> (95% CI)
Домінантна	0,667	1,110 (0,691-1,781)	0,743	1,085 (0,667-1,765)
Рецесивна	0,189	1,799 (0,749-4,320)	0,218	1,761 (0,716-4,333)
Супердомінантна	0,739	0,922 (0,571-1,487)	0,701	0,908 (0,556-1,484)
Аддитивна <sup>a</sup>	0,979	1,007 (0,613-1,653)	0,962	0,988 (0,594-1,643)
	0,201	1,805 (0,729-4,466)	0,239	1,751 (0,690-4,447)

Примітка. 95% CI – 95% довірчий інтервал; P<sub>спост</sub> – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR<sub>спост</sub> – спостережуване відношення шансів; P<sub>попр</sub> – значення P після поправки на вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку курити; OR<sub>попр</sub> – відношення шансів після поправки на коваріати.

<sup>a</sup> Перший рядок в аддитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу із С/С-генотипом, другий рядок - порівняння Т/Т-генотипу з генотипом С/С.

За останні роки виконано ряд робіт, присвячених вивченню впливу rs3025039-поліморфізму гена VEGFA із розвитком ЦД2 і його ускладнень. Так, колективом Sellami et al. показано зв'язок цього локусу із розвитком і тривалістю перебігу ЦД2 серед населення Тунісу [49]. Групою авторів Klimontov et al. встановлено зв'язок С936Т-сайту з концентрацією VEGFA в плазмі крові і розвитком ішемічної хвороби серця у пацієнтів з ЦД2 [51]. А результати нещодавнього мета-аналізу, виконаного Han et al., продемонстрували сильний зв'язок С936Т-поліморфізму гена VEGFA із ризиком розвитку діабетичної ретинопатії серед населення Китаю [53].

У нашій роботі вперше був проведений аналіз зв'язку С936Т-поліморфного сайту гена VEGFA з ризиком розвитку ЦД2 серед українських пацієнтів. Порівняння частот генотипів за вказаним локусом між пацієнтами експериментальної і контрольної груп, а також регресійний аналіз без і з поправкою на різні фактори ризику цукрового діабету не дозволили встановити



зв'язку поліморфного сайту С936Т гена VEGFA з настанням ЦД2 в українській популяції.

*Вивчення зв'язку генетичного поліморфізму BGLAP із розвитком цукрового діабету 2 типу.* Для визначення поліморфізму rs1800247 гена BGLAP був використаний метод PCR-RFLP. Ділянку гена BGLAP, що містить потрібний поліморфний локус, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) - 5'-CCGCAGCTCCCAACCACAATAAGCT-3' і зворотній (antisense) - 5'-CAATAGGGCGAGGAGT-3'. Праймери були синтезовані фірмою Metabion (Німеччина). Для проведення ПЛР брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеозидтрифосфатів, по 15 пмоль/л кожного з праймерів і 1 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), обсяг доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmpPCR System 2700 (ThermoFisher Scientific, США). Ампліфікація складалася з 33 циклів: денатурація - 94 ° С (60 с), гібридизація - 58 ° С (60 с) і елонгація - 72 ° С (60 с). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукт ампліфікації (250 п.н.) інкубували при 37°С протягом 18 год з 5 ОД рестриктази HindIII (ThermoFisher Scientific, США). Фрагменти рестрикції розділяли за допомогою електрофорезу в 2,0% агарозному гелі, що містить бромистий етидій. Статистичний аналіз проводився за допомогою програми SPSS 17.0.

Частота гомозигот за основним алелем (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і гомозигот за міноним алелем (С/С) у хворих на ЦД2 склав 66,0%, 26,1% та 7,9 % відповідно. Вказаний розподіл генотипів у контрольній групі становив 59,5%, 33,6% та 6,9%. У результаті математичного опрацювання було встановлена відсутність статистично значущої відмінності між частотами генотипів за rs1800247-локусом гена BGLAP у хворих на ЦД2 та особами контролю (P = 0,411).

## **6 ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ МАКРО- ТА МІКРОЕЛЕМЕНТНОГО СКЛАДУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ**

Експеримент був проведений на 12 білих щурах-самцях лінії Wistar зрілого віку. Тварини були розподілені на контрольну та експериментальну підгрупи (по 6 щурів у кожній).

Моделювання хронічної гіперглікемії у дослідній групі здійснювали за допомогою двотижневого навантаження тварин 10 % розчином фруктози з подальшим одноразовим інтраперитонеальним уведенням стрептозотоцину у дозі 40 мг/кг [86]. Підтвердження наявності гіперглікемії здійснювали оцінюючи вміст глюкози натще, інсуліну та С-пептиду в плазмі крові тварин. Також в рамках біохімічного аналізу крові визначали у щурів показники ліпідного обміну.

Визначення вмісту макро- та мікроелементів у зразках крові та скелетних м'язів щурів проводили методами атомно-абсорбційної спектроскопії з електротермічною та полуменевою атомізацією. Триголовий м'яз литки обсушували фільтрувальним папером для видалення надлишку рідин. Зважування зразків проводили у фторопластових стаканах на електронних аналітичних вагах ANG100C фірми «AXIS» II класу. Після зважування стакани зі зразками переносили у фторопластовий автоклав і вносили 3 мл нітратної кислоти для кислотної мінералізації. Вміст елементів у реактивах та на стінках посуду контролювали приготуванням «холостої проби».

Автоклави нагрівали на лабораторній електричній плитці Saturn ST-EC1161 із термостатом за температури 150–160 °C упродовж 2 годин, охолоджували, вміст стаканів переносили в мірні пробірки і доводили бідистилятом до 10 мл. Після автоклавної мінералізації отримували безбарвні прозорі рідини, придатні для визначення вмісту хімічних елементів атомно-абсорбційними методами.

Вміст К, Na та Ca визначали на спектрофотометрі S-115-M1 AT «Selmi» (Україна) з полуменевою атомізацією в режимі емісії (табл. 6.1).

Таблиця 6.1 – Спектральні умови вимірювання та атомізації для К, Na та Ca

Елемент	Довжина хвилі, нм	Спектральна щілина, нм	Горючий газ	Окисник	Тем-ра полум'я	Тип полум'я
К	769,9	0,4	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Повітря	2300	Окисне
Na	589,0	0,4	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Повітря	2300	Окисне
Ca	422,7	0,4	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	2950	Стехіометричне

Визначення концентрації Mg, Fe, Mn, Zn та Cu проводили на комплексі атомно-абсорбційному CAS-120.1 з електротермічним атомізатором А-5 і графітовою піччю Carl Zeiss Jena (Німеччина) в режимі адсорбції (табл. 6.2).

Таблиця 6.2 – Спектральні та температурно-часові режими вимірювань

Елемент	Довжина хвилі, нм	Ширина щілини, нм	Піроліз		Атомізація	
			Т, °С	τ, с	Т, °С	τ, с
Mg	202,6	0,4	1 000	10	2 200	5
Fe	372,0	0,4	1 000	10	2 500	5
Mn	279,5	0,4	1 000	10	2 500	4
Zn	213,9; 307,4	1,0	600	10	2 100	5
Cu	324,7	0,4	1 000	10	2 500	5

Проби відміряли і вносили в піч дозатором FAA-50 об'ємом 10 мкл. Аналітичний сигнал сканували з кроком 0,016 с та обробляли програмою «AAS-SPECTR3».

Статистичну аналіз виконували із використанням електронного пакету SPSS-15 (SPSS, version 15.0, Chicago, IL, USA). Перевірку на нормальність розподілу величин у різних вибірках проводили із розрахуванням критерію Колмогорова-Смірнова. Визначення достовірності відмінностей між двома контрольною та дослідною групами здійснювали із використанням критерію Стьюдента ( $t$ ). Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Результати біохімічного аналізу крові щурів груп порівняння представлені у таблиці 6.3. Встановлено, що в експериментальних тварин вміст глюкози крові

натще, загального холестеролу, тригліцеридів та ЛПНГ був значущо більшим, ніж у щурів контрольної групи. Натомість, концентрація ЛПВГ була вищою в інтактних тварин. Щодо інсуліну та С-пептиду, то вміст зазначених сполук в плазмі крові тварин обох груп був однаковим.

Таблиця 6.3 – Результати біохімічного аналізу крові щурів груп порівняння

Показник	Контроль (n = 6)	Гіперглікемія (n = 6)	P
Глюкоза натще, ммоль/л	9,51 ± 1,86	34,4 ± 2,93	< 0,001
Холестерол загальний, ммоль/л	1,89 ± 0,21	3,26 ± 0,36	< 0,001
Тригліцериди, ммоль/л	0,54 ± 0,11	1,03 ± 0,16	< 0,001
ЛПНГ, ммоль/л	0,59 ± 0,08	0,93 ± 0,12	< 0,001
ЛПВГ, ммоль/л	1,92 ± 0,20	1,48 ± 0,21	0,004
Інсулін, мкМО/мл	17,92 ± 1,17	13,48 ± 2,01	0,118
С-пептид, нг/мл	4,2 ± 0,43	3,3 ± 0,62	0,221

Примітка. Результати представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Порівняльний аналіз виконаний методом *t*-критерію для незалежних вибірок. ЛПНГ – ліпопротеїди низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїди високої густини.

У таблиці 6.4 наведені результати визначення елементного складу посмугованих м'язів щурів дослідної та контрольної груп. Шляхом порівняльного аналізу встановлено, що в триголову м'язі литки тварин із хронічної гіперглікемією концентрація К, Са, Fe, Zn та Cu була достовірно меншою, ніж у практично здорових щурів. Різниці між середніми значеннями вмісту Na і Mg між групами порівняння виявлено не було.

Таблиця 6.4 – Вміст макро- та мікроелементів у скелетних м'язах щурів без та з хронічною гіперглікемією

Група	Елемент						
	K (мг/г)	Na (мг/г)	Ca (мг/г)	Mg (мг/г)	Fe (мкг/г)	Zn (мкг/г)	Cu (мкг/г)
Контроль (n = 6)	3,51 ± 0,38	0,64 ± 0,27	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,09	18,3 ± 2,5	101,3 ± 23,1	0,37 ± 0,08
Експеримент (n = 6)	1,96 ± 0,26	0,37 ± 0,25	0,11 ± 0,02	0,24 ± 0,13	12,1 ± 2,3	10,4 ± 5,1	0,25 ± 0,09
P	< 0,001	0,101	< 0,001	0,374	0,001	0,001	0,038

Примітка. Результати представлені у вигляді  $M \pm SD$ . Порівняльний аналіз виконаний методом *t*-критерію для незалежних вибірок

Як вже зазначалось, макро- та мікроелементи відіграють значну роль у процесі розвитку ЦД2 та чутливості тканин до інсуліну. Так, наприклад, Ca і Mg є макроелементами, необхідними для гомеостазу вуглеводів, а також такими, що причетні до регуляції просвіту судинної стінки. При цьому дефіцити вказаних елементів може призводити до розвитку артеріальної гіпертензії та ускладнень, пов'язаних із хронічною гіперглікемією, включаючи зменшення секреції інсуліну. Крім того, було повідомлено про вплив макро- та мікроелементів на активність інсуліну та його наслідки для зменшення глюкози в крові [87]. Більшість макро- і мікроелементів, як правило, служать кофакторами ферментів. Відповідно, макро- та мікроелементи можуть активувати ділянки рецепторів інсуліну, необхідні для утилізації глюкози [88], які потенційно можуть підвищити чутливість до інсуліну або діяти як антиоксиданти для запобігання оксидативного ураження тканин [89].

У нещодавній роботі Siddiqui et al. представлені варіації вмісту макро- та мікроелементів у крові пацієнтів при прогресуванні ЦД2 [90]. Серед іншого було показано, що існують відмінності вмісту Fe, Cu, Zn, та Mn у сироватці крові пацієнтів із ЦД2 та осіб контрольної групи [91].

Схожі дані були отримані і в нашій роботі. Поряд з цим у дослідження Tennille et al. встановлено, що у скелетних м'язах щурів із ЦД2 спостерігається зменшення вмісту Ca, Zn, Fe та Cu на фоні збільшення концентрації Na і Mg [92]. Результати нашого експерименту також виявили зменшення вмісту Ca, Zn, Fe, Cu а також K у посмугованій мускулатурі щурів із хронічною гіперглікемією. Проте відмінності середніх значень концентрації Na та Mg між групами порівняння виявлено не було.

## ВИСНОВКИ

1. K121Q-поліморфізм гена ENPP1 асоційований з розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. У носіїв мінорного Q-алеля ризик розвитку ЦД2 в 1,4 рази вище, ніж у гомозигот за основним K-алелем. Ризик зростає у пацієнтів з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup>.
2. Поліморфізм rs997509 гена ENPP1 асоційований з розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. У носіїв мінорного T-алеля ризик його розвитку достовірно вище, ніж у гомозигот за основним алелем. Ризик зростає у гетерозигот з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> і осіб з ожирінням.
3. 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).
4. У представників української популяції відсутній зв'язок між поліморфізмами rs3025039 (ген VEGFA) та rs1800247 (ген BGLAP) і розвитком ЦД2 в українській популяції. Як до, так і після поправки на вік, стать, звичку куріння, індекс маси тіла, наявність ожиріння і артеріальної гіпертензії жоден з генотипів не був асоційований із ризиком розвитку ЦД2.
5. Результати представленої дослідження показали значну відмінність вмісту макро- та мікроелементів у скелетних м'язах щурів із хронічною гіперглікемією та тварин контрольної серії, що вказує на можливі відмінності у накопиченні елементів у тканинах за умов нормо- та гіперглікемії. Встановлено, що у скелетних м'язах щурів із хронічною гіперглікемією спостерігається зменшення вмісту K, Ca, Zn, Fe та Cu, порівняно із тваринами без порушень вуглеводного обміну. Останнє свідчить про те, що нестача зазначених елементів може відігравати важливу роль у розвитку гіперглікемічних станів та структурно-функціональних порушень посмугованої мускулатури за таких умов.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Karasik D. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases / D. Karasik, F. Rivadeneira, M.K. Johnson // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2016. – Vol. 12. – P. 323-334.
2. Association between the vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis / J. Wu, D. P. Shang, S. Yang [et al.] // *Biomedical Reports*. – 2016. – Vol. 5(2). – P. 233-236.
3. Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells / R. Florencio-Silva, G. Rodrigues, E. Sasso-Cerri [et al.] // *Bio Med Research International*. – 2015. – Vol. 17. – P. 1-17.
4. Панкратова Ю. В. Витамин К-зависимые белки: остеокальцин, матриксный Gla-белок и их внекостные эффекты / Ю. В.Панкратова, Е. А. Пигарова, Л. К. Дзеранова // *Ожирение и метаболизм*. – 2013. – № 2. – С. 11-18.
5. Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism / Y. Yoshikawa, A. Kode, L. Xu [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2012. – Vol. 26 (9). – P. 2012-2025.
6. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice / M. Ferron, M. McKee, R. Levine [et al.] // *Bone*. – 2012. – Vol. 50 (2). – P. 568-575.
7. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation / J. Wei, M. Ferron, C. Clarke [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 24. – P. 1-13.
8. Lecka-Czernik B. Energy Excess, Glucose Utilization, and Skeletal Remodeling: New Insights / B. Lecka-Czernik, C. Rosen // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2015. – Vol. 30 (8) – P. 1356-1361.
9. Histological and biomechanical analysis of the effects of streptozotocin-induced type one diabetes mellitus on healing of tentomized chilles tendons in rats / Z. Mohsenifar, M. Feridoni, M. Reza [et al.] // *Foot and Ankle Surgery*. – 2014. – Vol. 20 – P. 186-191.



10. Stefan C. Modulation of purinergic signaling by NNP-type ectophosphodiesterases / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Purinergic. Signal.* – 2006. – Vol. 2. – P. 361–370.
11. Johnson K. Inorganic pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of articular cartilage / K. Johnson, R. Terkeltaub // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 988–997.
12. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I. D. Goldfine, B. A. Maddux, J. F. Youngren et al. // *Endocrine Reviews.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 62–75.
13. Stefan C. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2005. – Vol. 30 (10). – P. 542–550.
14. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6 / Y. Nitschke, G. Baujat, U. Botschen et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2012. – Vol. 90. – P. 25–39.
15. Differential detergent resistance of the apical and basolateral NPPases: relationship with polarized targeting / J. L. Delaunay, M. Breton, J. W. Goding et al. // *J. Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 1009–1016.
16. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides / H. Zimmermann // *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2000. – Vol. 362. – P. 299–309.
17. Gijsbers R. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1 / R. Gijsbers, H. Ceulemans, M. Bollen // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 371. – P. 321–330.
18. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases on the move / M. Bollen, R. Gijsbers, H. Ceulemans, C. Stefan // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 393–432.

19. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family / H. Sakagami, J. Aoki, Y. Natori et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 23084–23093.
20. Zimmermann H. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases / H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Sträter // *Purinergic Signalling.* – 2012. – Vol. 8. – P. 437–502.
21. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I. D. Goldfine, B. A. Maddux, J. F. Youngren et al. // *Endocrine Reviews.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 62–75.
22. Picher M. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways – implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis / M. Picher, L. H. Burch, R. C. Boucher // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 20234– 20241.
23. Chen G. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation / G. Chen, C. Deng, Y. P. Li // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 2. – P. 272–288.
24. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis / L. E. Zweifler, M. K. Patel, F. H. Nociti et al. // *International Journal of Oral Science.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1–15.
25. ENPP1 K121Q polymorphism is not related to type 2 diabetes mellitus, features of metabolic syndrome, and diabetic cardiovascular complications in a Chinese population / M. P. Chen, F. M. Chung, D. M. Chang et al. // *The Review of Diabetic Studies.* – 2006. – Vol. 3, № 1. – P. 21–30.
26. Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets / B. LorenzDepiereux, D. Schnabel, D. Tiosano et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2010. – Vol. 86. – P. 267–272.

27. The Mutational Spectrum of ENPP1 as Arising After the Analysis of 23 Unrelated Patients with Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) / N. Ruf, B. Uhlenberg, R. Terkeltaub et al. // *Mutation in Brief*. – 2005. – Vol. 768. – P. 1–7.
28. Glucocorticoid hormones increase the activity of plasma membrane alkaline phosphodiesterase I in rat hepatoma cells / G. G. Rousseau, A. Amar-Costesec, M. Verhaegen, D. K. Granner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77, № 2. – P. 1005–1009.
29. Expression of the nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase PC-1 is induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and modulated by activation of the protein kinase A and C pathways in osteoblast-like osteosarcoma cells / J. L. Solan, L. J. Deftos, J. W. Goding, R. A. Terkeltaub // *J. Bone Miner. Res.* – 1996. – Vol. 11. – P. 183–192.
30. Regulation of purified hepatic PC-1 (phosphodiesterase-I/nucleotide pyrophosphatase) by threonine auto(de)phosphorylation and by binding of acidic fibroblast growth factor / M. Uriarte, W. Stalmans, S. Hickman, M. Bollen // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 306. – P. 271–277.
31. Interleukin 1  $\beta$  suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes / M. Lotz, F. Rosen, G. McCabe et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92. – P. 10364–10368.
32. Abhishek A. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis – role of ANKH / A. Abhishek, M. Doherty // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 96–104.
33. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity / H. N. Lyon, J. C. Florez, T. Bersaglieri et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 3180–3184.
34. Haplotype structure of the ENPP1 gene and nominal association of the K121Q missense single nucleotide polymorphism with glycemic traits in the Framingham Heart Study / E. S. Stolerman, A. K. Manning, J. B. McAteer et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1971–1977.

35. Гавриленко Т.И. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение / Т.И. Гавриленко, Н.А. Рыжкова, А.Н. Пархоменко // Укр. кардіол. журн. – 2011. – Т. 4. – С. 87-95.
36. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances induction of E-selectin by TNF- $\alpha$  / A.K. Stannard, R. Khurana, I.M. Evans [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 494-502.
37. Vascular protection: a novel nonangiogenic cardiovascular role for VEGF / I. Zachary, A. Mathur A., Yla-Herttuala S. [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1512-1520.
38. Inhibition of VEGF or TGF signaling activates endothelium and increases leucocyte rolling / T.E. Walshe, V.S. Dole, A. Maharaj [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1185-1192.
39. Ferrara N., Davis–Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara, T. Davis–Smyth // *Endocr. Rev.* – 1997. – Vol. 18. – P. 4–10.
40. Ferrara N. The biology of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara, T. Davis–Smyth // *Endocr. Rev.* – 1997. – Vol. 18. – P. 4–10.
41. Otrrock Z.K. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review / Z. Otrrock, J. Makarem, A. Shamseddine // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2007. – Vol. 38. – P. 258–268.
42. Kamba T. Mechanisms of adverse effects of anti VEGF therapy for cancer / T. Kamba, D. McDonald // *Br. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P.1788-1795.
43. A systemic biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use / F.T. Wu, M.O. Stefanini, F. Mac Gabhann [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14. – P. 528-552.
44. Mehta D. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability / D. Mehta, A. B. Malik // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 279-367.
45. Bates D.O. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors / D. O. Bates, S. Harper // *Vasc. Pharmacol.* – 2002. – Vol.39. – P. 225-237.

46. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells / D. T. Connolly, D. M. Heivelman, R. Nelson [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 4. – P. 1470-1478.
47. Bouloumie A. Vascular endothelial growth factor upregulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells / A. Bouloumie, V. SchiniKerth, R. Busse // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol. 41. – P. 773-780.
48. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis / S. Egginton // *Phlogers. Arc.* – 2009. – Vol. 457. – P. 963-977.
49. Dvorak H. F. Vascular permeability factor / Vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy / H. F. Dvorak // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol.20. – P. 4368-4380.
50. De Falko S. The discovery of placental growth factor and its biological activity / S. De Falko // *Exp. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 44. – P. 1-9.
51. A systemic biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use / F. T. Wu, M. O. Stefanini, F. Mac Gabhann [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2010. – Vol. 14. – P. 528-552.
52. D'Amore P.A. Vascular endothelial cell growth factor A. Not just for endothelial cells anymore / P. A. D'Amore // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – P.14-18.
53. Heparan sulfat regulates VEGF165 and VEGF121 mediated vascular hyperpermeability / D. Xu, M. Fuster, R. Lawrence [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 737-745.
54. Nicosia R. What Is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis? / R. Nicosia // *Am J Pathol.* – 1998. – Vol. 153(1). – P. 11-16.
55. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells / A. Namiki, E. Brogi, M. Kearney [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 31189-31905.
56. Systems biology of proangiogenic therapies targeting the VEGF system / F. Mac Gabhann, A. Qutub, B. Annex [et al.] // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 694-707.

57. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast / C Munaut, S. Lorquet, C. Pequeux [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23. P – 1407-1415.
58. Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia / M. Chiang, F. Liang, C. Chen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 284. – P. – 17411-17419.
59. Systems biology of proangiogenic therapies targeting the VEGF system / F. Mac Gabhann, A. Qutub, B. Annex [et al.] // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 2. – P. 694-707
60. Tsutsumi Y. Double face of VEGF / Y. Tsutsumi, D. Losordo // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1248-1250.
61. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M. Highley [et al.]// *Pharmacol Rev.* – 2004. – Vol. 56, №4, – P. 549-580.
62. Rahimi N. VEGFR1 and VEGFR2: two nonidentical twins with a unique physiognomy / N. Rahimi // *Front Biosci*–2006. – Vol. 11. – P. 818-829.
63. A two compartment model of VEGF distribution in the mouse / P. Yen, S. Finley, E. Stefanini [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 27514-27521.
64. Maharaj A.S. Roles for VEGF in adult / A. S. Maharaj, P. A. D'Amore // *Microvasc. Res.* – 2007. – Vol. 74. – P. 100-113.
65. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division / J. Kearney, C. Ambler, K. Monaco [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 99. – P. 2397-2407.
66. Wilson R.D. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes / R.D. Wilson, M.S. Islam // *Pharmacological Rep.* – 2012. – Vol. 64. – P. 129-139.
67. Tang S.T., Shen X.R., Tang H.Q. et al. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in different populations: evidence based on 40 studies // *Endocr. J.* – 2014. – Vol. 61 (11) – P. 1093-1103.

68. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults / N. Matsuoka, A. Patki, H.K. Tiwari, et al. // *International Journal of Obesity*. – 2006. – Vol. 30. – P. 233-237.
69. The PC-1 Q121 allele is exceptionally prevalent in the Dominican Republic and is associated with type 2 diabetes / K. Hamaguchi, H. Terao, Y. Kusuda et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2004 – 89. P. 1359-1364.
70. The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. / S.K. Rasmussen, S.A. Urhammer, A. Pizzuti et al. // *Diabetes* – 2000. – Vol. 49. – P. 1608-1611.
71. K121Q PC-1 gene polymorphism is not associated with insulin resistance in a Spanish population / J.L. González-Sánchez, M.T. Martínez-Larrad, C. Fernández-Pérez et al. // *Obes Res*. – 2003. – Vol. 11. – P. 603-605.
72. Sowers J.R. Treatment of hypertension in patients with diabetes / J. R. Sowers // *Arch. Intern. Med*. – 2004. – Vol. 164. – P. 1850-1857.
73. Stamler J. Stamler R., Neaton J.D. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks: US population data / J. Stamler, R. Stamler, J.D. Neaton // *Arch. Intern. Med*. – 1993. – Vol. 153. – P. 598-615.
74. Whitworth J.A. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension / J.A. Whitworth // *J. Hypertens*. – 2003. Vol. 21. – P. 1983-1992.
75. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism is not associated with type 2 diabetes in a Chinese population / D. Zhou, R. Ruiter, J. Zhang et al. // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. – 2012. Vol. 13 (3). – P. 372-378.
76. No association of TCF7L2 and ENPP1 gene polymorphisms in Malaysian type 2 diabetes mellitus with or without hypertension / R. Vasudevan, I. Patimah, A. Aisyah et al. // *Research Journal of Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 4 (6). – P. 703-709.
77. The K121Q polymorphism of the ENPP1/PC-1 genes is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and

- myocardial infarction / S. Bacci, O. Ludovico, S. Prudente et al. // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54 (10) – P. 3021-3025.
78. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals / J. Bochenski, G. Placha, K. Wanic et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55 (9) – P. 2626-2630. doi: 10.2337/db06-0191.
79. Effect of the rs997509 polymorphism on the association between ENPP1, metabolic syndrome and impaired glucose tolerance in childhood obesity / N. Santoro, G. Cirillo, M.G. Lepore et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94 (1). P. 300-305. doi: 10.1210/jc.2008-165
80. Contribution of ENPP1, TCF7L2, and FTO polymorphisms to type 2 diabetes in mixed ancestry ethnic population of South Africa / Y.Y. Yako, J.H. Madubedube, A.P. Kengne et al. // *Afri Health Sci*. – 2015. – Vol. 15 (4). – P. 1149-1160. <http://dx.doi.org/10.4314/ahs.v15i4.14>.
81. Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population / S. Robiou-du-Pont, A. Bonnefond, L. Yengo et al. // *International Journal of Obesity*. – 2013. Vol. 37. – P. 980-985. doi:10.1038/ijo.2012.175
82. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals / J. Bochenski, G. Placha, K. Wanic et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55 (9). – P. 2626-2630. doi:10.2337/db06-0191.
83. Contribution of ENPP1, TCF7L2, and FTO polymorphisms to type 2 diabetes in mixed ancestry ethnic population of South Africa / Y.Y. Yako, J.H. Madubedube, A.P. Kengne et al. // *Afri Health Sci*. – 2015. – Vol. 15 (4). – P. 1149-1160. <http://dx.doi.org/10.4314/ahs.v15i4.14>.
84. Association of the ENPP1 rs997509 polymorphism with obesity in South African mixed ancestry learners / T. Matsha, B. Fanampe, Y. Yako et al. // *East Afr Med J*. – 2010. – Vol. 87 (8). – P. 323-329.
85. Effect of the rs997509 polymorphism on the association between ENPP1, metabolic syndrome and impaired glucose tolerance in childhood obesity /



- N. Santoro, G. Cirillo, M.G. Lepore et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 94 (1). – P. 300-305. doi: 10.1210/jc.2008-1659.
86. Wilson R.D. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes / R. D. Wilson, M. S. Islam // *Pharmacological Rep.* – 2012. – Vol. 64. – P. 129-139.
87. Candilish D. J. Minerals. / D.J. Candilish // *Journal of the American College of Nutrition.* – 2000. – Vol. 17. – P. 286-310.
88. Vincent J.B. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes / J.B. Vincent // *Nutrition Reviews.* – 2000. – Vol. 58. – P. 67-72.
89. Kruse-Jarres J.D. Trace elements in diabetes mellitus. Peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells / J.D. Kruse-Jarres, M.R.Ukgauer // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2000. – Vol. 14. – P. 21-27.
90. Siddiqui K. Variation in Macro and Trace Elements in Progression of Type 2 Diabetes / K. Siddiqui, N. Bawazeer, S.J. Salini // *The Scientific World Journal.* – Volume 2014. doi:10.1155/2014/461591
91. Use of ion chromatography for the determination of selected metals in blood serum of patients with type 2 diabetes / A. Blazewicz, G. Orlicz-Szczesna, A. Prystupa et al. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2010. – Vol. 24. – P. 14-19.
92. The variation of macro- and micro-minerals of tissues in diabetic and non-diabetic rats / T.D. Presley, A.V. Duncan, A.B. Jeffers et al. // *J Trace Elem Med Biol.* – 2017. – Vol. 39. – P. 108-115.