



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 131229

(13) U

(51) МПК

G01N 33/573 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2018 07131**

(22) Дата подання заявки: **25.06.2018**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.01.2019**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.01.2019, Бюл.№ 1**

(72) Винахідник(и):

**Марченко Ірина Василівна (UA),
Гарбузова Вікторія Юрївна (UA),
Дубовик Євген Іванович (UA),
Атаман Олександр Васильович (UA)**

(73) Власник(и):

**СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми,
40007 (UA)**

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку цукрового діабету 2-го типу включає визначення rs997509 поліморфізму гена ENPP1 методом полімеразної ланцюгової реакції. Додатково проводять аналіз довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у пацієнтів з цукровим діабетом. При наявності мінорного Т-алеля прогнозують підвищений ризик розвитку ЦД 2-го типу.

UA 131229 U

Корисна модель належить до галузі теоретичної та клінічної медицини, а саме до патофізіології, ендокринології, діабетології та медичної генетики, і може бути використана з метою удосконалення прогнозування та профілактики цукрового діабету 2-го типу (ЦД 2-го типу).

5 Вивчення цукрового діабету, його ускладнень і супутніх патологій безперервно проводиться протягом багатьох років. Однак незважаючи на велику роботу і видатні досягнення у вивченні механізмів розвитку ЦД, а також успіхи в розробці нових лікарських препаратів для контролю глікемії, проблеми, пов'язані з пізніми ускладненнями, все одно продовжують наростати. Все це наштовхує на вивчення потенційних маркерів ЦД та ранньої діагностики розвитку і

10 прогресування його ускладнень.

ЦД 2-го типу має складний патогенез, який класично характеризується механізмом виникнення інсулінорезистентності та дисфункцією β -клітин підшлункової залози, зі зменшеною секрецією інсуліну. В цілому, ЦД 2-го типу розглядається як мультифакторіальне та полігенне захворювання. З генетичної точки зору ЦД 2-го типу являє собою складне захворювання, на

15 генетичний ризик якого впливають спільні ефекти варіації на невизначену кількість геномних сайтів, деякі з переважанням схильності, а деякі з захисним ефектом до хвороби.

На сьогоднішній день завдяки методу повногеномних асоціативних досліджень (GWAS) ідентифіковано велику кількість локусів, асоційованих з ЦД 2-го типу. Виявлені одонуклеотидні поліморфізми (ОНП) належать генам, експресія яких визначає синтез інсуліну, функціонування

20 β -клітин, кількість і чутливість інсулінових рецепторів, концентрацію глюкози в плазмі та розвиток ожиріння. На даний час налічується більше 200 відомих генів-кандидатів у розвитку ЦД 2-го типу [Gaulton KJ, Wilier CJ, Li Y et al. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. *Diabetes*. 2008; 57(11):3136-3144. doi:10.2337/db07-1731]. Одним із таких є ген ектонуклеотид пірофосфотази/фосфодіестерази 1 (ENPP1). Існує ряд доказів того, що ENPP1 сприяє розвитку цукрового діабету 2-го типу за рахунок впливу на тирозинкіназну активність α -субодиниці рецептора інсуліну, що призводить до інсулінорезистентності. По-перше, експресія ENPP1 виражена у тканинах, чутливих до інсуліну, таких як печінка, скелетні м'язи та жирова тканина, а також інших тканинах пацієнтів з інсулінорезистентністю [Goldfine ID, Maddux B A, Youngren JF, et al. Role of PC-1 in the etiology of insulin resistance. *AnnNYAcad Sci*. 1999;892:204-222]. По-друге, над експресія ENPP1 у культивованих клітинах викликає в них меншу чутливість до інсуліну [Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, et al. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1995;373:448-451]. По-третє, у трансгенних тваринах, з вираженою експресією ENPP1 у різних тканинах, в результаті експерименту розвивається

25 інсулінорезистентність та цукровий діабет 2-го типу [Maddux BA, Chang YN, Accili D et al. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290: E746-E749].

Таким чином, враховуючи переваги та недоліки сучасних методів діагностики та профілактики ЦД 2-го типу, питання оптимізації та удосконалення методики прогнозування з

30 метою попередження ЦД 2-го типу є актуальною та остаточно не вирішеною проблемою сучасної науки.

За найближчий аналог вибрано спосіб прогнозування виникнення інсулінорезистентності з урахуванням генотипу [Santoro N, Cirillo G, Lepore MG et al. Effect of the rs997509 Polymorphism on the Association Between ENPP1, Metabolic Syndrome and Impaired Glucose Tolerance in Childhood Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(1):300-5. doi: 10.1210/jc.2008-1659. PMID: 18940878], при якому ризик розвитку інсулінорезистентності, порушення толерантності до глюкози та виникнення метаболічного синдрому у дітей оцінювали на підставі визначення генотипу за поліморфізмом гену ENPP1 методом полімеразної ланцюгової реакції.

Зважаючи на те, що інсулінорезистентність відіграє ключову роль у розвитку цукрового

35 діабету 2-го типу даний метод можна використовувати для прогнозування ризику виникнення ЦД серед дорослого населення.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу прогнозування розвитку цукрового діабету 2-го типу та розширення показань (впровадження його) для прогнозування розвитку цукрового діабету у популяції з урахуванням rs997509 поліморфізму

40 гена ENPP1, що сприяє виникненню інсулінорезистентності.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі прогнозування розвитку цукрового діабету 2-го типу, що включає визначення rs997509 поліморфізму гена ENPP1 методом полімеразної ланцюгової реакції, згідно з корисною моделлю додатково проводиться аналіз довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у пацієнтів з цукровим діабетом, і при наявності

45 мінорного T-алеля прогнозують підвищений ризик розвитку ЦД 2-го типу.

На основі отриманих об'єктивних даних про наявність носійства мінорного алеля за даним поліморфізмом можна підвищити прогностичну цінність на ранніх етапах розвитку інсулінорезистентності, покращити діагностику цукрового діабету, раніше виявляти необхідність проведення профілактичних заходів, що дозволить впливати на модифіковані фактори ризику ЦД 2-го типу, а також суттєво знизити ризик розвитку його ускладнень.

Спосіб здійснюється таким чином: венозну кров, як матеріал дослідження, набирають в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти як антикоагулянт ("Sarstedt", Німеччина). Виділення геномної ДНК проводять з використанням комерційного набору "Diatom DNA Prep 100" (ТОВ "Лабораторія Ізоген", Росія) з наступним молекулярно-генетичним дослідженням поліморфного варіанта зазначеного гена.

Визначення rs997509 поліморфізму 1-го інтрону гена ENPP1 проводиться за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ділянку зазначеного гена ампліфікують за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (forward) 5'CTACCAAATATGGGCCACTGAT3' і зворотного (reverse) 5'CTGGACCAAGTGTТАССАСААА3' ("Metabion", Німеччина). Суміш для ампліфікації складається 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 доводиться до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента 1-го інтрону, що містить С43822Т-сайт, складається з 35 циклів: 1 цикл - 94 °С (4 хв), з 2 по 34 цикл - денатурація - 94 °С (50 с), гібридизація праймерів - 64 °С (40 с) і елонгація - 72 °С (1 хв), 35 цикл - 72 °С (5 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубують при 37 °С протягом 16 годин з 2 ОД рестриктази SsiI (Acil) ("Thermo Scientific", США) в буфері О наступного складу: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію і 0,1 мг/мл альбуміну. Результати рестрикційного аналізу оцінюють наступним чином: якщо в 43822-й позиції гена ENPP1 знаходиться цитозин, ампліфікат (475 пари основ), розщеплюється рестриктазою SsiI на два фрагменти - 223 і 252 пари основ; в разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для SsiI відсутній, і в суміші виявляється один фрагмент розміром 475 пари основ. Ампліфікати вивчених фрагментів 1-го інтрону гена ENPP1 розділяють в 2,5 % агарозному гелі, який містить бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1 А; 140V) проводиться протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснюють за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

За допомогою наведеного вище способу проведено обстеження 317 хворих з ЦД 2-го типу та 302 особи контрольної групи.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію регресії (P < 0,05 - статистична значущість; OR - відношення ризику).

Завдяки проведеному генотипуванню хворих з ЦД 2-го типу та осіб контрольної групи за поліморфним варіантом rs997509 гена ENPP1 були отримані результати, що наведені в таблиці.

Таблиця

Частота алельних варіантів за rs997509 поліморфізмом гена ENPP1 у групі хворих з ЦД 2-го типу та контрольній групі

Генотип	ЦД 2-го типу, n (%)		Контроль, n (%)		P_{HWE}	P
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		

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P - статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона.

Використання методу логістичної регресії дозволило довести існуючий зв'язок досліджуваного генетичного маркера та ЦД 2-го типу. Встановлено, що у носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу достовірно вище, ніж у гомозигот за основним С-алелем

(OR=2,086; P=0,027). Ризик зростає у осіб з $IMT \geq 25$ кг/м² (OR=2,223; P=0,031) і пацієнтів з ожирінням (OR=3,230; P=0,023).

5 Технічним результатом, що досягається запропонованим способом, є прогнозування ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу в осіб, що є носіями мінорного T-алеля за rs997509 поліморфізмом гена ENPP1. Отримані дані дозволяють виявляти осіб, генетично схильних до ЦД 2-го типу, проводити ранню діагностику інсулінорезистентності та сформуванати групу ризику щодо розвитку ЦД 2-го типу. Таким пацієнтам бажано рекомендувати контролювання модифікованих факторів ризику хвороби, проведення профілактичних заходів, що дозволить суттєво знизити ризик розвитку ЦД 2-го типу. Запропонований нами спосіб є інформативним та 10 проводиться один раз за життя пацієнта.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб прогнозування розвитку цукрового діабету 2-го типу, що включає визначення rs997509 поліморфізму гена ENPP1 методом полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що додатково проводять аналіз довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у пацієнтів з цукровим діабетом, і при наявності мінорного T-алеля прогнозують підвищений ризик розвитку ЦД 2-го типу.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601