

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

МАРЧЕНКО ІРИНА ВАСИЛІВНА

УДК 616.379-008.64:575.113.2(043.3)

**АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА
ЕКТОНУКЛЕОТИД ПРОФОСФАТАЗИ/ФОСФОДІЕСТЕРАЗИ 1 (*ENPP1*)
З РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ ТА ФАКТОРАМИ
ЙОГО РИЗИКУ**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Суми – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Сумському державному університеті МОН України.

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор
ГАРБУЗОВА ВІКТОРІЯ ЮРІЇВНА,
Сумський державний університет МОН України,
професор кафедри фізіології
і патофізіології з курсом медичної біології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ЗЯБЛИЦЕВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ,
Національний медичний університет
імені О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
професор кафедри патофізіології;

доктор медичних наук, професор
СИДОРЧУК ЛАРИСА ПЕТРІВНА,
Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний
університет» МОЗ України (м. Чернівці),
професор кафедри сімейної медицини.

Захист відбудеться «_____» _____ 2021 року о __ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті (40000, м. Суми, вул. Санаторна, 1).

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий «_____» _____ 2021 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук, доцент

О. С. Погорелова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цукровий діабет 2-го типу (ЦД 2-го типу) без перебільшення займає одну з драматичних сторінок світової медицини як захворювання, пов'язане з високим рівнем людських та економічних втрат. Складність проблеми обумовлена великою географічною поширеністю ЦД 2-го типу, дуже швидким зростанням захворюваності, високою смертністю від його ускладнень, що постійно прогресують, істотно знижуючи якість життя і скорочуючи його тривалість. Згідно з даними Міжнародної федерації діабету (IDF) на цей час у світі зареєстровано 463 млн випадків цукрового діабету, 90 % яких припадає на ЦД 2-го типу.

Цукровий діабет 2-го типу є мультифакторіальним захворюванням, розвиток якого обумовлений взаємодією генетичних факторів і факторів зовнішнього середовища. Роль генетичних факторів у розвитку ЦД 2-го типу може досягати 60 – 80 % (Kalinet M. F. et al., 2017). Серед факторів, що обумовлюють фенотипічну реалізацію спадкової схильності в цукровий діабет 2-го типу, виділяють ожиріння, малорухливий спосіб життя, недотримання дієти, психоемоційний стрес, паління і зловживання алкоголем.

Останніми роками одержані нові дані щодо патогенезу цукрового діабету 2-го типу. Так, за допомогою багатьох досліджень встановлено, що розвиток цукрового діабету 2-го типу обумовлений інсулінорезистентністю і порушенням функції β -клітин (Kesavadev J. et al, 2019; Sun X. et al, 2014). Співвідношення цих двох компонентів патогенезу ЦД 2-го типу різне як в окремих популяціях, так і в конкретних хворих однієї популяції. Не зовсім зрозуміло також, який із двох перелічених дефектів є первинним. У родичів першого ступеня споріднення хворих на цукровий діабет 2-го типу в період, коли є ще нормальна толерантність до глюкози, на момент обстеження вже виявляється зниження чутливості до інсуліну в м'язах за наявності гіперінсулінемії. У той самий час у хворих із ЦД 2-го типу, які мають нормальну або знижену масу тіла, на ранніх стадіях захворювання має місце інсулінопенія.

Тому не дивно, що за останнє десятиріччя світова наукова література поповнилася великою кількістю праць, присвячених дослідженню генетичної складової цукрового діабету 2-го типу (Guja C. et al, 2012; Wolfset M. G. et al, 2009; Komtoju U. J. et al, 2011). Зокрема, низкою праць про пошук зв'язку поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів, асоційованих із дисфункцією β -клітин підшлункової залози та генів, мутації яких спричиняють інсулінорезистентність, серед яких ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), певні алельні варіанти якого пов'язані з порушенням циторецепції інсуліну (C. Dimatteo et al., 2013). Дані щодо цього, одержані різними вченими, мають популяційні відмінності й не завжди збігаються. В Україні праці, спрямовані на пошук асоціації одонуклеотидних поліморфізмів гена *ENPP1* із розвитком цукрового діабету 2-го типу, відсутні. Останнє й спонукало нас до проведення власних досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Представлена дисертаційна робота виконана в рамках тем наукових досліджень «Патологічне значення поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку найпоширеніших патологічних процесів і хвороб людини» (державний

реєстраційний номер 0114U006297) і «Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії» (державний реєстраційний номер 0117U003926) та є частиною планових комплексних науково-дослідних тем кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету.

Мета дослідження – Аналіз асоціації поліморфних варіантів rs997509 та rs1044498 гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) із розвитком цукрового діабету 2-го типу в пацієнтів із різними факторами ризику.

Для реалізації мети було поставлено такі **завдання**:

1. Вивчити частоту алелів та генотипів поліморфних варіантів rs997509 і rs1044498 гена *ENPP1* у хворих із цукровим діабетом 2-го типу та осіб контрольної групи.
2. Дослідити асоціацію поліморфізму rs997509 гена *ENPP1* із виникненням цукрового діабету 2-го типу.
3. Встановити зв'язок алельного поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* із розвитком цукрового діабету 2-го типу.
4. Проаналізувати вплив одонуклеотидних поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* на виникнення ЦД 2-го типу в пацієнтів із різними факторами ризику.
5. Визначити вплив поліморфних варіантів (rs1044498 та rs997509) гена *ENPP1* на виникнення ЦД 2-го типу з урахуванням супутньої патології.
6. З'ясувати комплексний патогенетичний вплив rs997509- та rs1044498-поліморфізмів на розвиток ЦД 2-го типу.

Об'єкт дослідження – rs997509- та rs1044498-поліморфні варіанти гена *ENPP1*.

Предмет дослідження – участь одонуклеотидних поліморфізмів гена *ENPP1* (ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1) у розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Методи дослідження: клінічні та біохімічні методи дослідження, що підтверджують діагноз цукрового діабету 2-го типу і характеризують антропометричні, функціональні та інші показники життєдіяльності організму, молекулярно-генетичні методи визначення алельних варіантів гена *ENPP1* (виділення ДНК із лейкоцитів периферичної крові, полімеразна ланцюгова реакція з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP), горизонтальний електрофорез фрагментів ДНК), методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

Уперше в українській популяції встановлено, що поліморфізм rs997509 гена *ENPP1* асоційований із розвитком цукрового діабету 2-го типу. У носіїв мінорного T-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу в 2 рази вище, ніж у гомозигот за основним C-алелем. Також з'ясовано, що поліморфізм rs1044498 гена *ENPP1* асоційований із розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. Носії мінорного Q-алеля хворіють на ЦД 2-го типу в 1,4 раза частіше, ніж гомозиготи за основним K-алелем.

Досліджено, що існує достовірна відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509-поліморфним варіантом гена *ENPP1* серед жінок, хворих на ЦД 2-го типу, та осіб контрольної групи. Жінки з СТ-генотипом за rs997509-поліморфізмом мають утричі вищий ризик розвитку цукрового діабету ($P_{\text{спост}} = 0,031$; $OR_{\text{спост}} = 3,038$).

Виявлений вплив поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в пацієнтів старше 75 років. У цієї вікової групи носії мінорного Т-алеля за rs997509-поліморфізмом хворіють на цукровий діабет в 4,5 раза частіше ($OR_{\text{спост}} = 4,561$; $CI = 1,040-20,014$) в порівнянні з гомозиготами за основним С-алелем.

Установлено, що існує достовірна відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* серед осіб з ожирінням у групі цукрового діабету та контрольній групі ($P = 0,024$). В осіб з ожирінням, носіїв мінорного Т-алеля, ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу значно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем ($OR = 3,230$; $P = 0,023$).

Аналіз поєднаного впливу поліморфних сайтів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та відомих факторів ризику цукрового діабету 2-го типу дав можливість створити класифікаційну модель, що включає досліджувані поліморфні варіанти гена *ENPP1* та індекс маси тіла (прогностична значущість 57 % за методом MDR, $P < 0,0001$). Поєднання в однієї особи з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$ носійства мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона досліджуваного гена є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Практичне значення одержаних результатів

Одержані дані дозволяють прогнозувати ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу та його ускладнень в осіб, які є носіями мінорного алеля за досліджуваними поліморфізмами (rs997509 і rs1044498), виявляти осіб, генетично схильних до ЦД 2-го типу, проводити ранню діагностику інсулінорезистентності та формувати групу ризику щодо розвитку ЦД 2-го типу (патент України на корисну модель).

Результати досліджень, подані в дисертації, впроваджено в науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Медичного інституту Сумського державного університету, Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), Одеського національного медичного університету, Харківської академії післядипломної освіти, а також кафедри сімейної медицини Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці).

Особистий внесок здобувача

Автор самостійно провела патентно-інформаційний пошук, огляд та аналіз наукової літератури за темою дисертаційного дослідження, сформулювала мету і завдання роботи, розробила та обґрунтувала план досліджень. Дисертант особисто виконала молекулярно-генетичні дослідження в науковій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Медичного інституту Сумського державного університету МОН України (науковий керівник – проф. О. В. Атаман, завідувач лабораторії – проф. В. Ю. Гарбузова). Здобувач статистично опрацювала та проаналізувала

одержані результати, написала всі розділи дисертації й сформулювала висновки, а також підготувала матеріали до публікації.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації повідомлено та обговорено на XIX Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих учених, (Тернопіль 27–29 квітня 2015 р.); Global Students' Conference of Biomedical Sciences, (Belgrade, Serbia 15–18 October 2015); Республіканської науково-практичній конференції «Метаболический синдром: проблемы и достижения» (Ташкент 10 квітня 2015 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Алмати 23–24 квітня 2015 р.); European Human Genetics Conference: European Journal of Human Genetics (Barcelona, 2016); VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 5–7 жовтня 2016 р.); XIV науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті» (Харків, 24–25 листопада 2016 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасний мультидисциплінарний підхід до діагностики та лікування хворих на цукровий діабет» (Тернопіль, 11–12 травня 2017 р.); Науковій конференції «XVI читання В.В. Підвисоцького» (Одеса, 18–19 травня 2017 р.); XXII Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (Тернопіль, 23–25 квітня 2018 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (Запоріжжя, 17–18 травня 2018 р.), на засіданні кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Медичного інституту СумДУ (витяг із протоколу засідання кафедри № 6 С.3 від 22 вересня 2020 року).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, із яких 6 статей (2 – в зарубіжному виданні, що обліковується наукометричною базою даних Scopus, 4 – у фахових виданнях, що входять до переліку ДАК України), 13 тез доповідей (1 – в зарубіжному виданні, що обліковується наукометричною базою даних Scopus) у матеріалах конгресів та конференцій, 1 патент на корисну модель. Дві наукові праці опубліковано за одноосібної участі автора.

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційну роботу викладено на 151 сторінках (основний обсяг становить 114 сторінок). Вона складається із вступу, чотирьох розділів: огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнень результатів дослідження, а також висновків і додатків. Список використаних джерел містить 210 найменувань (17 – кирилицею, 193 – латиницею). У роботі наведено 16 рисунків, 25 таблиць, 3 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження

Характеристика клінічного матеріалу. У дослідженні була використана венозна кров 317 пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу (51,1 % жінок і 48,9 % чоловіків із середнім віком $64,9 \pm 8,2$ роки), та 302 осіб (45,7 % жінок і 54,3 %

чоловіків з середнім віком $65,1 \pm 14,5$ роки), які становили контрольну групу. Пацієнтів із цукровим діабетом було відібрано в Сумській обласній клінічній лікарні, Сумській міській клінічній лікарні № 5 і Тростянецькій районній лікарні. Усі хворі були з діагнозом ЦД 2-го типу легкої або середньої тяжкості. Відповідний діагноз в обстежених хворих був установлений/підтверджений на підставі збирання анамнезу, клінічних та біохімічних методів досліджень (клінічний аналіз крові й сечі, визначення глюкози крові натщесерце, глікемічного профілю та глікозильованого гемоглобіну) відповідно до рекомендацій експертів ВООЗ. Пацієнти дослідної групи були на пероральній цукрознижувальній терапії (8 % – монотерапія метформіном або препаратами сульфонілсечовини, 92 % – комбінована терапія метформіном та препаратами сульфонілсечовини). До дослідження не входили пацієнти з гострими або хронічними запальними процесами на стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями, вираженою нирковою і печінковою недостатністю, травмою або великим хірургічним втручанням, а також особи, які отримували медикаменти, що можуть потенційно впливати на рівень глюкози крові. Контрольну групу склали особи без цукрового діабету. Відсутність цукрового діабету та інших мультифакторіальних захворювань підтверджувалася шляхом збирання анамнестичних даних, вимірюванням рівня глікемії натще, зняттям ЕКГ, вимірюванням артеріального тиску і проведенням клінічних та біохімічних досліджень.

Робота виконана відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участі людини в якості об'єкта дослідження» і схвалена Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед входженням до дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду на використання крові у генетичних дослідженнях.

Молекулярно-генетичні дослідження. Алельні поліморфізми rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікацію проводили впродовж 35 циклів. Режимми ампліфікації ділянок ДНК, що містять досліджувані поліморфізми, та нуклеотидна послідовність праймерів («Metabion», Німеччина) подані в таблиці 1.

Таблиця 1 – **Режими ампліфікації**

Поліморфізм	Нуклеотидна послідовність праймерів	Режим ампліфікації		
		D	H	E
rs997509	Fwd: 5' CTACCAATATGGGCCACTGAT 3' Rev: 5' CTGGACCAAGTGTTACCACAAA 3'	94 °C (50 с)	64 °C (40 с)	72 °C (1 хв)
rs1044498	Fwd: 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' Rev: 5' GACGCTGGAAGATACCAGGCTG 3'	94 °C (50 с)	64,5 °C (45 с)	72 °C (1 хв)

Примітка: Fwd – прямий праймер; Rev – зворотний праймер; D – денатурація; H – гібридизація праймерів; E – елонгація

Для рестрикційного аналізу 6 мкл отриманого продукту ампліфікації інкубували з відповідною рестриктазою: 2 ОД *SsiI* (*AciI*) («Thermo Scientific», США) – rs997509; 5 ОД *Eco47I* (*AvaII*) («Thermo Scientific», США) – rs1044498. Ампліфікати вивчених фрагментів 1-го інтрона та 4-го екзона гена *ENPP1* розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1 А; 140 V) проводили впродовж 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою трансільюмінатора («Біоком», Росія).

Методи статистичного аналізу. Статистичне опрацювання основної частини роботи реалізоване з використанням програми SPSS-17.0 (США). Перевірку безперервних даних на нормальність розподілів здійснювали за допомогою тесту Шапіро - Вілка. Визначення достовірності різниць середніх значень між двома вибірками проводилося за допомогою t-критерію Стюдента. Для порівняння розподілу алелів і генотипів у дослідній та контрольній групах, а також із метою перевірки відповідності цього розподілу рівновазі Харді – Вайнберга застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Для встановлення ризику розвитку ЦД 2-го типу залежно від наявності в пацієнта певного генотипу за допомогою бінарної логістичної регресії розраховували відношення шансів (OR) та 95 % довірчий інтервал (CI) для можливих моделей успадкування. Моделювання міжлокусних взаємодій для вивчення поєданого впливу генетичного поліморфізму *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу здійснювали за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR).

Результати досліджень та їх обговорення

Ураховуючи, що серед осіб обох груп порівняння не виявлено жодного пацієнта з генотипом Т/Т за генетичним поліморфізмом rs997509, для подальшого аналізу одержаних результатів гетерозигот (С/Т) та гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) було об'єднано в одну групу (С/Т + Т/Т). Для зручності подальшого аналізу одержаних результатів за rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* гетерозигот (К/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) було також об'єднано в одну групу (К/Q + Q/Q).

Аналізуючи одержані результати за генетичним поліморфізмом rs997509 виявлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С) та носіїв мінорного Т-алеля (С/Т + Т/Т) серед пацієнтів із ЦД 2-го типу становило 89,0 та 11,0 %, що достовірно відрізнялося від розподілу генотипів серед осіб контрольної групи – 94,4 та 5,6 % ($P = 0,015$). Вивчаючи розподіл генотипів за rs1044498-поліморфізмом, виявлені подібні результати. Серед пацієнтів із цукровим діабетом та осіб контрольної групи співвідношення генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) дорівнювало 59,3 та 40,7 % порівняно з 67,9 і 32,1 % ($P = 0,027$) відповідно (рис. 1). Отже, статистично значущими є відмінності розподілу генотипів за досліджуваними поліморфними локусами між групами порівняння, що свідчить про асоціацію rs997509- та rs1044498-поліморфних варіантів гена *ENPP1* із розвитком ЦД 2-го типу.

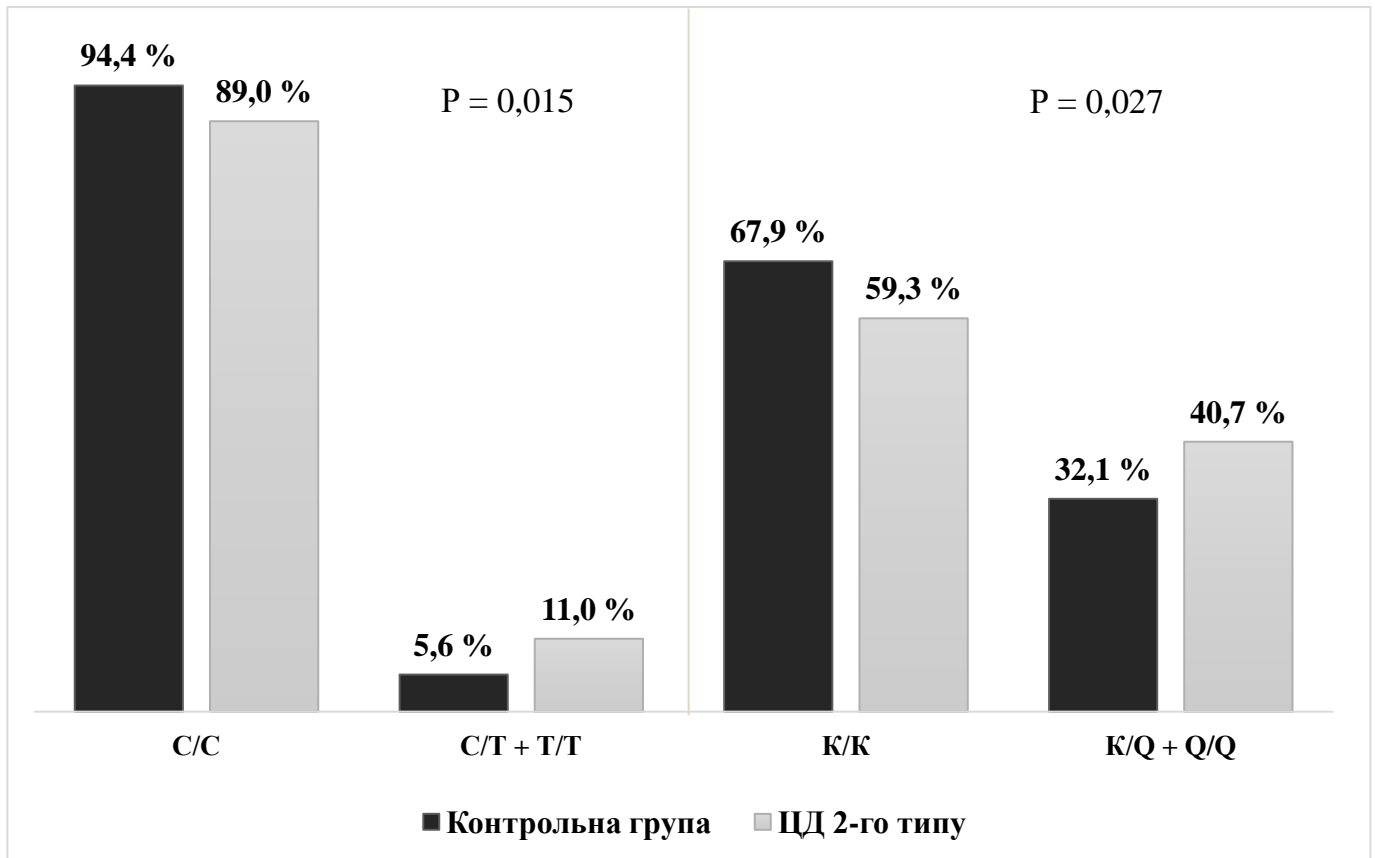


Рисунок 1 – Частота генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у хворих із цукровим діабетом 2-го типу (сірі стовпчики) та серед пацієнтів контрольної групи (чорні стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* із розвитком ЦД 2-го типу в рамках різних моделей успадкування наведені в таблиці 2.

Методом бінарної логістичної регресії встановлений достовірний зв'язок у рамках СТ vs СС-моделі успадкування за rs997509-поліморфізмом ($P_{\text{спост}} = 0,017$) та домінантної моделі успадкування (KQ/QQ vs K/K) за rs1044498-поліморфним варіантом гена *ENPP1* ($P_{\text{спост}} = 0,027$). Розрахунок відносного ризику в рамках представлених моделей показав, що в носіїв мінорного Т-алеля ЦД 2-го типу спостерігався удвічі частіше (95 % CI = 1,139–3,800), ніж у гомозигот за основним С-алелем за rs997509-поліморфним локусом досліджуваного гена. Ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу був у 1,4 раза (95 % CI = 1,043–2,016) вищий у носіїв мінорного Q-алеля, ніж у гомозигот за основним алелем (K/K) за rs1044498-поліморфним варіантом гена *ENPP1*. Після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ, ожиріння та наявність артеріальної гіпертензії достовірність цих результатів зберігалася. Результати аналізу в рамках інших моделей успадкування не були статистично значущими.

Таблиця 2 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	P _{спост}	OR _{спост} (95 % CI)	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)
Загалом					
rs997509	CT vs CC	0,017	2,081 (1,139–3,800)	0,027	2,086 (1,089–3,996)
rs1044498	KQ 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)
	QQ vs K/K	0,099	1,877 (0,889–3,962)	0,479	1,337 (0,598–2,989)
Жінки					
rs997509	CT vs CC	0,031	3,038 (1,109–8,326)	0,040	3,130 (1,053–9,306)
rs1044498	KQ vs K/K	0,147	1,491 (0,869–2,226)	0,372	1,299 (0,731–2,308)
	KQ/QQ vs K/K	0,033	1,750 (1,046–2,927)	0,046	1,619 (1,022–2,117)
	QQ vs K/K	0,168	2,082 (0,733–5,908)	0,479	1,494 (0,491–4,552)
ІМТ ≥ 25 кг/м²					
rs997509	CT vs CC	0,032	2,089 (1,066–4,090)	0,031	2,223 (1,076–4,594)
rs1044498	KQ 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)
	QQ vs K/K	0,054	2,375 (0,984–5,730)	0,048	1,802 (1,063–3,653)
Ожиріння					
rs997509	CT vs CC	0,029	2,863 (1,114–7,356)	0,023	3,230 (1,175–8,881)
rs1044498	KQ 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)
	QQ vs K/K	0,062	2,924 (0,946–9,036)	0,129	2,472 (0,769–7,942)
Артеріальна гіпертензія					
rs997509	CT vs CC	0,018	3,271 (1,223–8,746)	0,045	2,792 (1,023–7,622)
rs1044498	KQ 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)
	QQ vs K/K	0,373	1,510 (0,610–3,734)	0,807	1,125 (0,437–2,901)

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

Аналіз за віком. Усіх хворих було розділено на три групи відповідно до існуючих хронологічних періодів у пізньому онтогенезі людини: I група – 45–59 років; II група – 60–74 роки; III група – 75 років і старше. У таблиці 3 поданий розподіл генотипів за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу, різних за віком виявлення захворювання.

З'ясовано, що співвідношення генотипів за генетичним поліморфізмом rs997509 (C/C та C/T + T/T) серед пацієнтів обох груп порівняння в I групі було 96,0 і 4,0 % порівняно з 88,8 і 11,2 %, у II групі – 87,0 і 13,0 % порівняно з 89,2 і 10,8 %, та в III групі – 97,2 і 2,8 % порівняно з 88,4 і 11,6 % відповідно. Статистично

значуща відмінність одержаних результатів спостерігалась у I ($P = 0,034$) та III ($P = 0,030$) вікових групах хворих. Під час вивчення одержаних результатів розподілу за rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* виявили, що частота алельних варіантів за досліджуваним поліморфізмом серед контрольної групи та хворих із ЦД 2-го типу в різних вікових групах достовірно не відрізнялася ($P = 0,263$, $P = 0,177$, $P = 0,467$ відповідно).

Таблиця 3 – Розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу, різних за віком виявлення недуги

Генотип	Вік хворих із ЦД 2-го типу					
	I група		II група		III група	
	Контроль	ЦД 2-го типу	Контроль	ЦД 2-го типу	Контроль	ЦД 2-го типу
rs997509						
C/C (%)	121 (96,0)	95 (88,8)	60 (87,0)	149 (89,2)	104 (97,2)	38 (88,4)
C/T + T/T (%)	5 (4,0)	12 (11,2)	9 (13,0)	18 (10,8)	3 (2,8)	5 (11,6)
χ^2	4,492		0,247		4,731	
P	0,034		0,619		0,030	
rs1044498						
K/K (%)	91 (72,2)	70 (65,4)	45 (65,2)	93 (55,7)	69 (64,5)	25 (58,1)
K/Q + Q/Q (%)	35 (27,8)	37 (34,6)	24 (34,8)	74 (44,3)	38 (35,5)	18 (41,9)
χ^2	1,254		1,826		0,528	
P	0,263		0,177		0,467	

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

У таблиці 4 наведені результати регресійного аналізу зв'язку між генетичними маркерами цукрового діабету 2-го типу rs997509 та rs1044498 і таким фактором ризику як вік.

Таблиця 4 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб різних вікових груп з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)
I група					
rs997509	CT vs CC	0,042	3,057 (1,041–8,977)	0,067	3,188 (0,923–11,007)
rs1044498	KQ vs K/K	0,462	1,247 (0,692–2,245)	0,628	1,178 (0,607–2,285)
	KK/KQ vs K/K	0,264	1,374 (0,787–2,400)	0,811	1,080 (0,573–2,037)
	QQ vs K/K	0,380	1,694 (0,522–5,501)	0,638	0,732 (0,200–2,684)
II група					
rs997509	CT vs CC	0,620	0,805 (0,343–1,893)	0,526	0,740 (0,291–1,880)
rs1044498	KQ vs K/K	0,252	1,420 (0,779–2,588)	0,263	1,440 (0,760–2,728)
	KK/KQ vs K/K	0,178	1,492 (0,834–2,670)	0,263	1,429 (0,765–2,668)
	QQ vs K/K	0,617	1,401 (0,374–5,255)	0,971	1,027 (0,243–4,332)
III група					
rs997509	CT vs CC	0,044	4,561 (1,040–20,014)	0,084	4,306 (0,820–22,606)
rs1044498	KQ vs K/K	0,986	0,993 (0,467–2,113)	0,751	0,878 (0,392–1,964)
	KK/KQ vs K/K	0,468	1,307 (0,634–2,696)	0,695	1,166 (0,542–2,509)
	QQ vs K/K	0,107	3,556 (0,761–16,610)	0,127	3,741 (0,687–20,360)

Примітка: Див. таблицю 2

Статистично достовірна асоціація без урахування факторів ризику діабету була виявлена серед пацієнтів I та III вікових груп у рамках СТ vs СС-генетичної моделі успадкування ($P_{\text{спост}} = 0,042$ та $P_{\text{спост}} = 0,044$). З'ясувалося, що серед осіб старше 75 років, носіїв мінорного Т-алеля за rs997509-поліморфізмом, ризик виникнення діабету в 4,5 раза ($OR_{\text{спост}} = 4,561$; $CI = 1,040-20,014$) вищий порівняно з гомозиготами за основним С-алелем. Проте статистична значущість OR втрачалася після поправки на стать, ІМТ, ожиріння, артеріальну гіпертензію та звичку палити. Результати аналізу в рамках інших моделей не досягали статистичної значущості як до, так і після поправки на фактори ризику в жодній віковій групі.

Аналіз за статтю. Під час аналізу розподілу можливих генотипів за поліморфізмом 1-го інтрона гена *ENPP1* окремо серед осіб жіночої статі було встановлено, що хворих із ЦД 2-го типу носіїв основного С-алеля, було 87 %, а мінорного Т-алеля – 13 % (у групі порівняння це співвідношення становило 95,3 та 4,7 % відповідно) ($P = 0,024$). Співвідношення генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) за rs1044498-поліморфізмом серед жінок у досліджуваній групі становило 56,2 і 43,8 %, а в контрольній групі – 69,2 і 30,8 % відповідно ($P = 0,032$). Виявлено, що існує достовірна відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфними варіантами гена *ENPP1* серед пацієток із цукровим діабетом та осіб контрольної групи.

Результати поглибленого вивчення зв'язку між досліджуваними SNP гена *ENPP1* та розвитком ЦД 2-го типу в осіб жіночої статі за допомогою методів логістичної регресії показали, що серед жінок із СТ-генотипом за rs997509-поліморфізмом ризик розвитку цукрового діабету вищий утричі ($P_{\text{спост}} = 0,031$; $OR_{\text{спост}} = 3,038$) (табл. 2). Цей зв'язок був підтверджений після урахування таких факторів ризику діабету, як вік, ІМТ, ожиріння, звичка палити та артеріальна гіпертензія ($P_{\text{попр}} = 0,040$; $OR_{\text{попр}} = 3,130$). За допомогою аналізу в рамках домінантної моделі (КQ/QQ vs К/К) успадкування за rs1044498-поліморфізмом також виявлено асоціацію зазначеного поліморфного локусу з ризиком діабету в жінок ($P_{\text{спост}} = 0,033$; $OR_{\text{спост}} = 1,750$). Після поправки на фактори ризику діабету ці дані були підтверджені ($P_{\text{попр}} = 0,046$; $OR_{\text{попр}} = 1,619$).

Результати статистичного аналізу окремо серед осіб чоловічої статі продемонстрували, що розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* достовірно не відрізняється між чоловіками із цукровим діабетом 2-го типу в анамнезі та контрольної групи ($P = 0,308$; $P = 0,370$). Дослідження генотипної асоціації поліморфних локусів першого інтрона та четвертого екзона гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі за допомогою мультіваріабельної логістичної регресії в жодній із представлених моделей успадкування не встановив достовірного впливу досліджуваних генетичних маркерів на розвиток ЦД 2-го типу як до, так і після поправки на вік, ІМТ, ожиріння, артеріальну гіпертензію та звичку палити ($P > 0,05$).

Аналіз за ІМТ та наявністю ожиріння. Під час дослідження впливу генетичних поліморфізмів rs997509 та rs1044498 на розвиток ЦД 2-го типу в осіб із нормальною та надмірною вагою тіла, усіх осіб обох груп було поділено на дві підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ ($< 25 \text{ кг/м}^2$ і $\geq 25 \text{ кг/м}^2$).

Методом бінарної логістичної регресії виявлено вплив генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфними варіантами гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в осіб із підвищеним ІМТ (табл. 2). Установлено достовірний зв'язок між rs997509-поліморфізмом та ЦД 2-го типу в осіб з $\text{ІМТ} \geq 25 \text{ кг/м}^2$ ($P = 0,032$) в рамках СТ vs СС-генетичної моделі успадкування. Цей зв'язок зберігався після поправки на такі фактори ризику ЦД 2-го типу, як вік, стать, наявність артеріальної гіпертензії і звичку палити. Виявлено, що у осіб із підвищеним ІМТ, носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу достовірно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем ($\text{OR}_{\text{попр}} = 2,223$; $\text{CI} = 1,076\text{--}4,594$; $P_{\text{попр}} = 0,031$). Аналіз у рамках рецесивної моделі (QQ vs K/K) за rs1044498-поліморфізмом досліджуваного гена серед пацієнтів з $\text{ІМТ} \geq 25 \text{ кг/м}^2$ продемонстрував близьку до рівня статистичної значущості відмінність між пацієнтами з ЦД 2-го типу та особами контрольної групи ($P = 0,054$). Проте статистична значущість OR підтверджувалася після поправки на вік, стать, артеріальну гіпертензію та звичку палити ($P_{\text{попр}} = 0,048$). Виявилося, що в осіб з Q/Q-генотипом ризик розвитку ЦД 2-го типу зростає в 1,8 раза ($\text{CI} = 1,063\text{--}3,653$). Результати аналізу в межах інших моделей не були значущими ($P > 0,05$).

Застосування регресійного аналізу для вивчення асоціації різних генотипів за поліморфними сайтами першого інтрона та четвертого екзона гена *ENPP1* з розвитком цукрового діабету 2-го типу серед осіб з супутнім ожирінням дозволило встановити, що в рамках генетичної моделі успадкування СТ vs СС за SNP rs997509 в осіб із С/Т-генотипом ризик виникнення ЦД 2-го типу був у 2,8 раза ($\text{CI} = 1,114\text{--}7,356$; $P_{\text{спост}} = 0,029$) вищим, ніж у гомозигот за основним алелем (табл. 2). Після урахування статі, віку, звички палити та артеріальної гіпертензії достовірність результату зберігалася ($P_{\text{попр}} = 0,023$), а ризик збільшувався в 3,2 раза ($\text{CI} = 1,175\text{--}8,881$). Застосування бінарної логістичної регресії в межах жодної з можливих моделей успадкування за SNP rs1044498 не виявило достовірного зв'язку досліджуваного поліморфізму з розвитком ЦД 2-го типу ($P > 0,05$).

Аналіз за звичкою палити. Результати дослідження асоціації вивчених поліморфізмів гена *ENPP1* із розвитком цукрового діабету 2-го типу в осіб, які палять, у рамках різних моделей успадкування показали, що дані поліморфні сайти не впливають на ризик виникнення діабету як до, так і після поправки на фактори ризику ($P > 0,05$).

Аналіз за супутньою артеріальною гіпертензією. Регресійний аналіз продемонстрував, що серед осіб з артеріальною гіпертензією носіїв Т-алеля за SNP rs997509 ризик розвитку цукрового діабету був у 3,2 раза вищим (95 % $\text{CI} = 1,223\text{--}8,746$; $P_{\text{спост}} = 0,018$), ніж у гомозигот за основним С-алелем (відповідно до моделі СТ vs СС) (табл. 2). Ці результати підтверджувалися після врахування віку, статі, ІМТ, ожиріння та звички пацієнта палити ($\text{OR} = 2,792$, $\text{CI} = 1,023\text{--}7,622$; $P_{\text{попр}} = 0,045$). Застосування бінарної логістичної регресії в межах жодної з можливих моделей успадкування за SNP rs1044498 не виявило достовірного зв'язку досліджуваного поліморфізму з розвитком ЦД 2-го типу ($P > 0,05$).

Поєднаний вплив одонуклеотидних поліморфізмів (rs997509 та rs1044498) гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу продемонстрував, що локуси зазначених SNP перебувають у міцному нерівноважному зчепленні ($D' = 0,970$,

$r^2 = 0,157$), що дозволило визначити частоту гаплотипів, які утворюють rs997509- та rs1044498-поліморфізми гена *ENPP1*, та провести аналіз їх асоціації з розвитком ЦД 2-го типу (табл. 5). З одержаних даних бачимо, що гаплотип СТ у групі хворих із цукровим діабетом 2-го типу зустрічався достовірно частіше, ніж у контролі, та збільшував ризик розвитку діабету в 1,9 раза (95 % CI = 1,045–3,44; P = 0,035). Гаплотип АС, навпаки, частіше спостерігався серед здорових осіб, що мало статистичну значущість та свідчило про його протективну роль у патогенезі ЦД 2-го типу (OR = 0,698; 95 % CI = 0,530–0,920; P = 0,011). Відмінності щодо частоти гаплотипу СС між групами порівняння виявлено не було (P = 0,128).

Таблиця 5 – Аналіз розподілу гаплотипів гена *ENPP1* у хворих з ЦД 2-го типу та осіб контрольної групи

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

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

Насупним етапом нашої роботи було вивчення поєднаного впливу поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 на розвиток цукрового діабету 2-го типу за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR). Використовуючи сучасні підходи до статистичного аналізу, ми створили класифікаційну модель, що дозволяє прогнозувати ризик розвитку діабету в загальній популяції, а також діагностувати його в необстежених пацієнтів. Модель АС&СТ, що включала досліджувані SNP rs997509 та 1044498, мала прогностичну здатність 54,5 % на навчальній (Training Balanced Accuracy) і 53,1 % – на тестованій вибірці (Testing Balanced Accuracy) з крос-перевірною здатністю 10/10 (Crossvalidation Consistency). Виявлено, що збіг гетерозигот (К/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) за SNP rs1044498 та одним із будь-яких можливих генотипів (С/С або С/Т) за SNP rs997509 асоціюється з високим ризиком розвитку ЦД 2-го типу. Водночас збіг гомозигот за основним К-алелем поліморфізму 4-го екзона з носіями мінорного Т-алеля поліморфного сайту 1-го інтрона також призводить до значного збільшення ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Також методом MDR встановлено, що частка ентропії (найбільший незалежний ефект) щодо статусу «випадок – контроль», пов'язана з локусами СТ та АС, приблизно однакова й дорівнює 0,70 та 0,71 % відповідно. Аналіз міжлокусних взаємодій виявив відсутність синергічного ефекту між досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1*, навпаки, між ними спостерігався слабкий нейтралізуючий ефект (–0,79 %). Застосування пермутаційних (рандомізованих) тестів виявило те, що наведена двокомпонентна модель є статистично значущою (P = 0,022).

За допомогою методу MDR для більш поглибленого вивчення поєднаного впливу досліджуваних одонуклеотидних поліморфних варіантів гена *ENPP1* на

розвиток цукрового діабету 2-го типу ми провели аналіз серед осіб різної статі. З'ясувалося, що в жінок, як і в загальній групі, прогностична здатність двокомпонентної моделі на навчальній вибірці (Training Balanced Accuracy) становила 56,9 %, а на тестованій (Testing Balanced Accuracy) – 54,1 % із крос-перевірною здатністю (Crossvalidation Consistency) 10/10. Виявлено, що в разі збігу будь-якого з варіантів генотипів за rs1044498-поліморфізмом та носіїв мінорного T-алеля за rs997509-поліморфізмом ризик розвитку ЦД 2-го типу в осіб жіночої статі значно зростає. Ризик цукрового діабету 2-го типу також збільшувався в разі поєднання носіїв мінорного Q-алеля за поліморфізмом 4-го екзона гена *ENPP1* з гомозиготами за основним алелем SNP rs997509.

Також встановлено, що найбільший незалежний ефект щодо статусу «випадок – контроль» у жінок був пов'язаний із поліморфним локусом rs997509 гена *ENPP1* (1,49 %). Під час вивчення міжлокусних взаємодій виявили виражений нейтралізуючий ефект між досліджуваними SNP гена *ENPP1*. Після проведення пермутаційних тестів було з'ясовано, що ця модель є статистично значущою ($P = 0,025$).

Аналізуючи поєднаний вплив поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу, за допомогою методу MDR в осіб чоловічої статі виявлено, що в разі збігу носіїв мінорного алеля одного SNP з іншим ризик значно зростає. На тестованій вибірці така модель мала прогностичну здатність 48,8 % (крос-перевірна здатність – 10/10).

Ураховуючи той факт, що ЦД 2-го типу є мультифакторіальною патологією, останнім кроком нашого дослідження було проведення аналізу поєднаного впливу генетичного поліморфізму окремо з відомими факторами ризику цукрового діабету 2-го типу за допомогою методу зменшення багатфакторної розмірності. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність на тестованій вибірці (57 %) мала трикомпонентна модель, що включала поліморфні сайти rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* та індекс маси тіла (крос-перевірна здатність – 10/10). З одержаних даних виявилось, що ризик виникнення діабету зростає в разі поєднання одного з варіантів генотипів K/K, K/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона та носіями мінорного T-алеля поліморфізму 1-го інтрона досліджуваного гена в осіб з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$.

Кластерний аналіз показав, що найбільша частка ентропії серед усіх факторів належала індексу маси тіла (1,90 %). Проте картина міжфакторної взаємодії характеризувалася нейтралізуючим ефектом між двома досліджуваними поліморфізмами (–0,79 %) та окремо між кожним із них та ІМТ (–0,70 % – для сайту rs997509; –0,71 % – для SNP rs1044498). Рандомізовані тести показали, що така трикомпонентна модель досягає рівня статистичної значущості ($P < 0,0001$).

Також прогностичну здатність на тестованій вибірці мала двокомпонентна модель, що включала поліморфні локуси rs997509 і rs1044498 гена *ENPP1* в осіб з ожирінням (Testing Balanced Accuracy – 58,6 %, Crossvalidation Consistency – 10/10). Комбінація гомозигот за мінорним Q-алелем за rs1044498-поліморфним сайтом та носіїв основного C-алеля за rs997509-поліморфізмом досліджуваного гена є предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу в осіб з ожирінням. Також ризик виникнення діабету зростає в разі поєднання будь-якого з

трьох можливих алельних варіантів за rs1044498-поліморфним локусом та носіями мінорного T-алеля за поліморфізмом 1-го інтрона гена *ENPP1*. Результати пермутаційних тестів продемонстрували, що зазначена модель досягає рівня статистичної значущості ($P = 0,002$).

Кластерний аналіз показав, що приблизно однакова частка ентропії належала поліморфним локусам rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* в осіб з ожирінням (1,94 та 1,92 % відповідно). Картина міжфакторної взаємодії відзначалася нейтралізуючим ефектом між двома досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* в осіб з ожирінням (-0,19 %).

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення й нові результати, що вирішують наукове завдання, суть якого полягає в аналізі асоціації поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 з розвитком цукрового діабету 2-го типу та факторами його ризику.

1. Визначені частоти мінорних алелів за поліморфними варіантами гена *ENPP1* в осіб контрольної групи відповідають більшості європейських популяцій і становлять 0,18 для поліморфізму rs1044498 і 0,03 – для поліморфізму rs997509. Існує відмінність щодо розподілу алельних варіантів між групою пацієнтів із ЦД 2-го типу та здорових осіб за досліджуваними поліморфними локусами rs997509 ($P = 0,015$) та rs1044498 ($P = 0,027$) гена *ENPP1*.
2. Існує зв'язок між поліморфним сайтом rs997509 першого інтрона гена *ENPP1* та розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. У носіїв мінорного T-алеля ЦД 2-го типу зустрічається вдвічі частіше, ніж у гомозигот за основним C-алелем ($OR_{\text{попр}} = 2,086$; $P_{\text{попр}} = 0,027$).
3. Однонуклеотидний поліморфізм четвертого екзона rs1044498 гена *ENPP1* асоційований з розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. У носіїв мінорного Q-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу в 1,4 раза вищий, ніж у гомозигот за основним K-алелем ($OR_{\text{попр}} = 1,455$; $P_{\text{попр}} = 0,026$).
4. Вплив поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу має вікові особливості. Установлено, що серед осіб старше 75 років, носіїв мінорного T-алеля за rs997509-поліморфізмом ризик виникнення діабету в 4,5 раза ($OR_{\text{спост}} = 4,561$; $CI = 1,040-20,014$) вищий порівняно з гомозиготами за основним C-алелем.
5. Виявлена достовірна відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфними варіантами гена *ENPP1* серед жінок, хворих на ЦД 2-го типу, та осіб контрольної групи. Жінки з СТ-генотипом за rs997509-поліморфізмом мають втричі вищий ризик розвитку цукрового діабету ($P_{\text{спост}} = 0,031$; $OR_{\text{спост}} = 3,038$). Аналіз у рамках домінантної моделі (KQ/QQ vs K/K) успадкування за rs1044498-поліморфізмом також виявив асоціацію зазначеного поліморфного локусу з ризиком діабету в жінок ($P_{\text{спост}} = 0,033$; $OR_{\text{спост}} = 1,750$).
6. Доведена асоціація поліморфних варіантів гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в пацієнтів із супутньою патологією: в осіб з ожирінням, носіїв

мінорного Т-алеля, ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу значно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем (OR = 3,230; P = 0,023). Серед осіб із супутньою артеріальною гіпертензією, носіїв Т-алеля за SNP rs997509, ризик розвитку цукрового діабету в 3,2 раза вищий (95 % CI = 1,223–8,746; P_{спост} = 0,018), ніж у гомозигот за С-алелем.

7. Гаплотип СТ за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* пов'язаний із підвищеним ризиком розвитку ЦД 2-го типу (95 % CI = 1,045–3,44; P = 0,035), а гаплотип АС має протективне значення (OR = 0,698; 95 % CI = 0,530–0,920; P = 0,011). Створена класифікаційна модель, що включає досліджувані поліморфні сайти гена *ENPP1* та індекс маси тіла (прогностична значущість 57 % за методом MDR, P < 0,0001), продемонструвала, що поєднання в однієї особи з ІМТ ≥ 25 кг/м² носійства мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона досліджуваного гена є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Марченко І. В., Дубовик Е. І., Ткач Г. Ф. Асоціація rs997509-поліморфізма гена *ENPP1* с розвитком сахарного діабета 2-го типу в українській популяції. *Wiadomości Lekarskie*. 2018. Т. 71, № 3, ч. 1. С. 490–495. URL: <https://cutt.ly/wjF0cwR>. (Внесок дисертанта: проведення молекулярно-генетичних досліджень, статистичний аналіз результатів та підготовка статті до друку).
2. Марченко І. В., Дубовик Е. І., Матлай О. І. Аналіз асоціації K121Q-поліморфізма гена *ENPP1* с факторами ризику розвитку сахарного діабета 2-го типу в українській популяції. *Wiadomości Lekarskie*. 2018. Т. 71, № 4. С. 815–820. URL: <https://cutt.ly/LjKqcXx>. (Внесок дисертанта: проведення молекулярно-генетичних досліджень та підготовка статті до друку).
3. Марченко І. В. Аналіз поєданого впливу поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* з розвитком цукрового діабету 2-го типу. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2018. Т. 6, № 2. С. 278–284. URL: https://ujcem.med.sumdu.edu.ua/images/sampleddata/2018/2/278284_2018-27.pdf.
4. Марченко І. В., Гарбузова Є. А., Дубовик Є. І. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2018. Т. 6, № 1. С. 170–175. URL: https://ujcem.med.sumdu.edu.ua/images/sampleddata/2018/1/20_2018-12.pdf. (Внесок дисертанта: проведення молекулярно-генетичних досліджень та підготовка статті до друку).
5. Марченко І. В. Аналіз зв'язку rs997509-поліморфізму гена *ENPP1* з деякими факторами ризику цукрового діабету 2-го типу. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т. 3, № 5. С. 115–119. DOI: 10.26693/jmbs03.05.115.
6. Марченко І. В., Гарбузова В. Ю., Дубовик Є. І. Зв'язок різних варіантів генотипу поліморфізмів rs1044498 та rs997509 гена *ENPP1* з показниками вуглеводного та ліпідного обміну у хворих із ЦД 2-го типу. *Буковинський медичний*

вісник. 2018. Т. 22, № 2, ч. 86. С. 41–46. DOI: 10.24061/2413-0737.XXII.2.86.2018.31. (Внесок дисертанта: проведення молекулярно-генетичних досліджень та підготовка статті до друку).

7. Спосіб прогнозування розвитку цукрового діабету 2-го типу : пат. на корисну модель 131229 Україна / І. В. Марченко, В. Ю. Гарбузова, Є. І. Дубовик, О. В. Атаман ; заявник і патентовласник Сумський держ. ун-т. № u201807131 ; заявл. 25.06.2018 ; опубл. 10.01.19, Бюл. № 1.

8. Грибова И. В., Гарбузова В. Ю., Обухова О. А. Сравнительный анализ распределения K121Q полиморфных вариантов гена ENPP1 у пациентов с сахарным диабетом 2 типа разных популяций. Материалы Республиканской научно-практической конференции «*Метаболический синдром: проблемы и достижения*» (Ташкент, 10 апр. 2015 г.). Ташкент, 2015. С. 38–39.

9. Грибова І. В. Частота алельних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1) за поліморфізмом K121Q у пацієнтів на цукровий діабет 2-го типу з різним індексом маси тіла. *Матеріали ХІХ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених* (Тернопіль, 27–29 квіт. 2015 р.). Тернопіль, 2015. С. 281.

10. Грибова И. В., Гарбузова В. Ю., Обухова О. А. Сравнительный анализ распределения K121Q полиморфных вариантов гена ENPP1 у курящих и не курящих пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Материалы II Международной научно-практической конференции «*Наука и медицина: современный взгляд молодежи*» (Алматы, 23–24 апр. 2015 г.). Алматы, 2015. С. 355–356.

11. Grybova I., Harbuzova V., Obukhova O. Association K121Q polymorphism of ENPP1 gene in smokers and non-smokers among patients with type 2 diabetes mellitus in Ukrainian population. *Materials of the 2nd Global Students' Conference of Biomedical Sciences* (Belgrade, Serbia, 15–18 Oct. 2015). Belgrade, 2015. P. 103.

12. Grybova I., Harbuzova V., Obukhova O. Association of ENPP1 polymorphism K121Q with type 2 diabetes mellitus and stroke in Ukrainian population. *Materials of European Human Genetics Conference : European Journal of Human Genetics*. Barcelona, 2016. P. 188.

13. Марченко І. В., Удовиченко Б. Я., Гарбузова В. Ю. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском. Матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України за міжнародної участі «*Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції*» (Харків, 5–7 жовт. 2016 р.). Харків, 2016. С. 153.

14. Марченко І. В. Генетичні та вікові чинники як фактори ризику цукрового діабету 2-го типу у пацієнтів з різними варіантами генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1. Матеріали XIV науково-практичної конференції за міжнародної участі «*Ендокринна патологія у віковому аспекті*» (Харків, 24–25 листоп. 2016 р.). Харків, 2016. С. 56–57.

15. Marchenko I. Analysis association of K121Q polymorphism ENPP1 gene from development of hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «*Сучасний мультидисциплінарний*

підхід до діагностики та лікування хворих на цукровий діабет» (Тернопіль, 11–12 трав. 2017 р.). Тернопіль, 2017. С. 66.

16. Марченко І. В., Обухова О. А., Зарва А. О. Зв'язок поліморфізму K121Q гена ENPP1 у хворих із ЦД 2-го типу з деякими показниками вуглеводного та ліпідного обміну. Матеріали наукової конференції «*XVI чтения В. В. Подвысоцкого*» (Одеса, 18–19 трав. 2017 р.). Одеса, 2017. С. 227.

17. Марченко И. В. Связь полиморфизма K121Q гена ENPP1 у больных с СД 2 типа с показателями глюкозы и гликозилированного гемоглобина. Материалы Республиканской научно-практической конференции «*Метаболический синдром и другие категории дисметаболизма в различных областях медицины*» (Ташкент, 13 апр. 2017 г.). Ташкент, 2017. С. 91.

18. Марченко І. В. Асоціація rs997509 поліморфізму гена ENPP1 з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з різним індексом маси тіла. *Матеріали XXII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих учених* (Тернопіль, 23–25 квіт. 2018 р.). Тернопіль, 2018. С. 267.

19. Марченко І. В. Асоціація rs997509 поліморфізму гена ENPP1 з розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «*Актуальні питання сучасної медицини і фармації*» (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (Запоріжжя, 17–18 трав. 2018 р.). Запоріжжя, 2018. С. 19.

20. Марченко І. В., Гарбузова В. Ю., Атаман О. В. Аналіз зв'язку rs997509-поліморфізму гена ENPP1 з цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі. Матеріали наукової конференції «*XVII читання В. В. Підвисоцького*» (Одеса, 24–25 трав. 2018 р.). Одеса, 2018. С. 29.

АНОТАЦІЯ

Марченко І. В. Аналіз асоціації поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1) з розвитком цукрового діабету 2-го типу та факторами його ризику. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2021.

Дисертація присвячена вивченню впливу поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1) (rs997509 та rs1044498) на розвиток цукрового діабету 2-го типу. Установлено, що в представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфними сайтами rs997509 та rs1044498 і ризиком розвитку ЦД 2-го типу. Носії мінорного Т-алеля (rs997509) мають удвічі більшу ймовірність захворюваності на цукровий діабет, ніж гомозиготи за основним С-алелем. Зазначений ризик зростає в осіб жіночої статі, пацієнтів із надмірною вагою, ожирінням та артеріальною гіпертензією. Установлено, що серед осіб старше 75 років, носіїв мінорного Т-алеля, ризик виникнення діабету в 4,5 рази вищий порівняно з гомозиготами за основним

С-алелем. Ризик розвитку ЦД 2-го типу в носіїв мінорного Q-алеля (rs1044498) у 1,4 раза вищий, ніж у носіїв основного К-алеля. Зазначений ризик зростає в осіб жіночої статі. Аналіз поєднаного впливу показав, що гаплотип СТ за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* пов'язаний із підвищеним ризиком розвитку ЦД 2-го типу, а гаплотип АС, навпаки, має протективне значення. Поєднання в однієї особи з ІМТ ≥ 25 кг/м² носійства мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона досліджуваного гена є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, поліморфізм гена, ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, *ENPP1*, *PC-1*.

АННОТАЦІЯ

Марченко И. В. Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена эктонуклеотид пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (*ENPP1*) с развитием сахарного диабета 2-го типа и факторами его риска. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (доктора философии) по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Сумский государственный университет МОН Украины, Сумы, 2021.

Диссертация посвящена изучению влияния полиморфных вариантов гена эктонуклеотид пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1 (*ENPP1*) (rs997509 и rs1044498) на развитие сахарного диабета 2-го типа. Установлено, что у представителей украинской популяции существует связь между частотой генотипов по полиморфным сайтам rs997509 и rs1044498 и риском развития СД 2-го типа. Носители мінорного Т-аллеля (rs997509) имеют в 2 раза большую вероятность заболеваемости сахарним діабетом, чем гомозиготы по основному С-аллелю. Указанный риск возрастает у лиц женского пола, пациентов с избыточным весом, ожирением и артериальной гипертензией. Установлено, что среди лиц старше 75 лет, носителей мінорного Т-аллеля, риск возникновения диабета в 4,5 раза выше по сравнению с гомозиготами по основному С-аллелю. Риск развития СД 2-го типа у носителей мінорного Q-аллеля (rs1044498) в 1,4 раза выше, чем у носителей основного К-аллеля. Указанный риск возрастает у лиц женского пола. Анализ сочетанного воздействия показал, что гаплотип СТ за исследуемыми полиморфизмами гена *ENPP1* связан с повышенным риском развития СД 2-го типа, а гаплотип АС, наоборот, имеет защитное значение. Сочетание у одного человека с ІМТ ≥ 25 кг/м² носительства мінорного Т-аллеля за поліморфізмом 1-го інтрона и одного из вариантов генотипов К/К, К/Q или Q/Q по поліморфізму 4-го екзона исследуемого гена является значимым предиктором повышенного риска развития сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, полиморфизм гена, эктонуклеотид пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 1, *ENPP1*, *PC-1*.

SUMMARY

Marchenko I. V. Association analysis of the polymorphic variants of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) gene with the development of type 2 diabetes mellitus and its risk factors. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the Candidate Degree in Medical Sciences (Doctor of Philosophy): Specialty 14.03.04 – pathological physiology. – Sumy State University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2021.

Thesis is dedicated to the study of of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) polymorphic variants impact on the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

The study used venous blood from 317 patients with type 2 diabetes (51.1 % of women and 48.9 % of men, average age of 64.9 ± 8.2 years), and 302 individuals (45.7 % of women and 54.3 % of men, average age of 65.1 ± 14.5 years) who comprised the control group. Determination of polymorphic loci of the 1st intron – rs997509 and the 4th exon – rs1044498 of the *ENPP1* gene was performed using polymerase chain reaction method followed by analysis of the restriction fragments length. The amplifiers of the studied fragments were separated in a 2.5 % agarose gel containing ethidium bromide. Horizontal electrophoresis is performed for 30 minutes. Statistical analysis was performed using the SPSS-17 program. Simulation of interlocus interactions to study the combined effect of *ENPP1* gene polymorphic variants on the development of type 2 diabetes was implemented using the method of multivariate dimensional reduction (MDR). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

The *ENPP1* gene (rs997509-, rs1044498-polymorphism) is associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the Ukrainian population. The influence of *ENPP1* gene polymorphic variants on the development of type 2 diabetes mellitus has age-specific features. It was discovered that among people older than 75 years, carriers of the minor T-allele by rs997509-polymorphism, have 4.5 times (OR = 4,561; CI = 1,040–20,014) higher the risk of diabetes than homozygotes for the main C-allele. As a result of our studies, we found that among women with CT-genotype by rs997509 polymorphism the risk of developing diabetes is 3 times higher ($P = 0.031$; OR = 3.038). Analysis within the dominant model (KQ/QQ vs K/K) of inheritance by rs1044498 polymorphism has also revealed the association of this polymorphic locus with the risk of diabetes in women ($P = 0.033$; OR = 1.750). Studying the association of gene polymorphic variants of the *ENPP1* with the development of type 2 diabetes mellitus and its risk factors, we found out that there is a significant difference in the distribution of genotypes by *ENPP1* gene rs997509-polymorphism among obese individuals in diabetes and control groups ($P = 0.024$). It was discovered that in obese carriers of the minor T-allele the risk of developing type 2 diabetes is much higher than in homozygotes with the main C-allele (OR = 3.230; $P = 0.023$). The combination in one individual with a BMI ≥ 25 kg/m² of the minor T-allele of the 1st intron polymorphism and one of the variants of genotypes K/K, K/Q or Q/Q by the 4th exon polymorphism of the studied gene is a significant predictor of increased risk development of type 2 diabetes.

Key words: type 2 diabetes mellitus, gene polymorphism, pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 ectonucleotide, *ENPP1*, *PC-1*.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія.

АТ – артеріальний тиск.

ЕКГ – електрокардіограма.

ІМТ – індекс маси тіла.

ЦД – цукровий діабет.

А – аденін.

С – цитозин.

СІ – довірчий інтервал.

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1.

G – гуанін.

MDR – зменшення багатofакторної розмірності.

OR – відношення шансів.

PC-1 – глікопротеїн-1 мембрани плазматичної клітини.

PCR – полімеразна ланцюгова реакція.

PCR-RFLP – полімеразна ланцюгова реакція з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів.

SNP – однонуклеотидний поліморфізм.

T – тимін.

Підписано до друку 03.03.2021.
Формат 60x90/16. Ум. друк. арк. 1,1. Обл.-вид. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Зам. № 169.

Видавець і виготовлювач
Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.