

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

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**Марченко Ірина Василівна**

УДК 616.379-008.64:575.113.2(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук/

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ І. В. Марченко

Науковий керівник – Гарбузова Вікторія Юріївна, доктор біологічних наук,  
професор

Суми – 2021

## 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.

### **Актуальність теми**

Цукровий діабет – одна з основних медико-соціальних проблем сучасного суспільства, що обумовлено його значною поширеністю, високою інвалідизацією та смертністю. За даними ВООЗ та Міжнародної діабетичної федерації (IDF), станом на 2019 рік у світі нараховується 463 млн хворих на цю патологію, а до 2045 року прогнозується збільшення кількості хворих до 700 млн. Епідеміологічні дослідження ЦД 2-го типу в Україні також свідчать про постійне збільшення кількості хворих. Так, за останні 10 років темп приросту показника поширеності ЦД 2-го типу в нашій країні становив 43 %, а кількість пацієнтів перевищила 2 млн осіб. Саме ЦД 2-го типу є переважною формою діабету в усьому світі, що становить 85–95 % усіх випадків цього захворювання.

Постійне зростання кількості хворих на ЦД 2-го типу вимагає вдосконалення існуючих методів діагностики та лікування цієї патології для підвищення ефективності системи спеціалізованої кваліфікованої допомоги. Існують численні докази того, що механізми розвитку цукрового діабету залежать від генетичної схильності. Тому вивчення впливу однонуклеотидних поліморфізмів генів, що впливають на інсулінорезистентність чи спричиняють дисфункцію  $\beta$ -клітин підшлункової залози, є однією з найактуальніших проблем діагностики ЦД 2-го типу.

Одним із генів-кандидатів ЦД 2-го типу є ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*, *PC-1*), білковий продукт якого пригнічує дію інсуліну на клітини-мішені. *ENPP1*, впливаючи на тирозинкіназну активність  $\alpha$ -субодиниці, перешкоджає аутофосфорилуванню рецептора інсуліну і подальшому утворенню білків-транспортів глюкози. Унаслідок цього виникає хронічна гіперглікемія, гіперінсулінемія і інсулінорезистентність.

Таким чином, генетичний поліморфізм *ENPP1* пов'язаний із порушенням циторецепції гормону, що перешкоджає подальшому передаванню сигналів інсуліну та може бути використаний як маркер ЦД 2-го типу. 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.

#### **Характеристика клінічного матеріалу**

У дослідженні використано венозну кров 317 пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу (51,1 % жінок і 48,9 % чоловіків із середнім віком  $64,9 \pm 8,2$  років), та 302 особи (45,7 % жінок і 54,3 % чоловіків з середнім віком  $65,1 \pm 14,5$  років), які становили контрольну групу. Відповідний діагноз в обстежених хворих був встановлений/підтверджений на підставі збирання анамнезу, клінічних та біохімічних методів досліджень (клінічний аналіз крові й сечі, визначення глюкози крові натще, глікемічного профілю та глікозильованого гемоглобіну) і 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 становили 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 та проведенням клінічних і 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 в генетичних дослідженнях.

#### **Методи дослідження**

Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія) з подальшим молекулярно-генетичним дослідженням поліморфних варіантів гена *ENPP1*.

Визначення поліморфних локусів 1-го інтрона – rs997509, та 4-го екзона – rs1044498, гена *ENPP1* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Для ампліфікації ділянок зазначеного гена використовували праймери, синтезовані фірмою «Metabion» (Німеччина), та ферменти (Taq-полімераза і рестриктази) фірми «ThermoFisher Scientific» (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 50–100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,5 Од Taq-полімерази. Режими PCR склалися із 35 циклів. Отриманий продукт ампліфікації (6 мкл) для рестрикційного аналізу

поліморфізму rs997509 гена *ENPP1* інкубували за температури 37°C упродовж 16 годин із 2 ОД рестриктази *SsiI* (*Acil*) («Thermo Scientific», США) в буфері О. Результати аналізу оцінювали таким чином: якщо в 43822-й позиції гена *ENPP1* містився цитозин, ампліфікат (475 пар основ) розщеплювався рестриктазою *SsiI* на два фрагменти – 223 і 252 пари основ; в разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для *SsiI* був відсутній, і в суміші виявляли один фрагмент розміром 475 пар основ.

Для рестрикційного аналізу поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували за температури 37°C упродовж 18 годин із 5 ОД рестриктази *Eco47I* (*AvaII*) («Thermo Scientific», США) у буфері R. Якщо в 43213-й позиції гена *ENPP1* містився цитозин, ампліфікат, що складався з 238 пар основ, розщеплювався рестриктазою *Eco47I* на два фрагменти – 148 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін сайт рестрикції для *Eco47I* втрачався та утворювався пар основ один фрагмент розміром 238 пар основ.

Ампліфікати вивчених фрагментів розділяли у 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 транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перевірку відмінності розподілу генотипів здійснювали за допомогою  $\chi^2$ -критерію Пірсона. Для встановлення ризику розвитку цукрового діабету 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. Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення (linkage disequilibrium (LD)) використовували програму Arlequin (версія 3.1). Моделювання міжлокусних взаємодій для вивчення поєданого впливу поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток ЦД 2-го типу реалізовували

за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR). Значення  $P < 0,05$  вважали статистично достовірним.

### Результати власних досліджень

Визначені частоти мінорних алелів за поліморфними варіантами гена *ENPP1* в осіб без цукрового діабету 2-го типу відповідають більшості європейських популяцій і становлять 0,03 для поліморфізму rs997509 та 0,18 – для поліморфізму rs1044498. Уперше в українській популяції встановлено, що поліморфізм rs997509 гена *ENPP1* асоційований з розвитком цукрового діабету 2-го типу. У носіїв мінорного T-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу вдвічі вищий, ніж у гомозигот за основним C-алелем. Також з'ясовано, що поліморфізм rs1044498 гена *ENPP1* асоційований з 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.

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. У результаті наших досліджень виявлено, що існує 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. Виявлено що серед жінок із СТ-генотипом за rs997509-поліморфізмом ризик розвитку цукрового діабету втричі вищий ( $P_{\text{спост}} = 0,031$ ;  $OR_{\text{спост}} = 3,038$ ). 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 ( $P_{\text{спост}} = 0,033$ ;  $OR_{\text{спост}} = 1,750$ ). Вивчаючи асоціацію поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 з розвитком цукрового діабету 2-го типу та факторами його ризику,

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

Аналіз поєднаного впливу поліморфних сайтів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 і відомих факторів ризику цукрового діабету 2-го типу дав можливість створити класифікаційну модель, що включає досліджувані поліморфні сайти 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 T-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів K/K, K/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 (rs1044498 та rs997509), 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).

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

## 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 української 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 української 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](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](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 І. 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 XIX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених* (Тернопіль, 27–29 квіт. 2015 р.). Тернопіль, 2015. С. 281.
10. Грибова І. 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-практична конференція «*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.

## ABSTARCT

*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.

### **Topic Relevance**

Diabetes is one of the most important and main medical and social problems of modern society, due to its wide prevalence, high risk of disability and mortality. According to the WHO and the International Diabetes Federation (IDF), as of 2019, there are 463 million patients with this pathology in the world, and by 2045 the number of patients is predicted to increase to 700 million. Epidemiological studies of type 2 diabetes in Ukraine also show a constant increase of patient number. Thus, over the past 10 years the growth rate of type 2 diabetes prevalence in our country was 43 %, and the number of patients exceeded 2 million people. Type 2 diabetes is a predominant form of diabetes worldwide, accounting for 85–95 % of all cases.

The constant growth in the number of patients with type 2 diabetes requires the improvement of existing diagnosis and treatment methods of this pathology in order to increase the efficiency of the specialized and qualified care system. There is ample evidence that the mechanisms of diabetes mellitus depend on genetic predisposition. Therefore, the impact of gene single nucleotide polymorphisms on insulin resistance or their cause of pancreas  $\beta$ -cells dysfunction is one of the most pressing problems in the diagnosis of type 2 diabetes.

One of the candidate genes for type 2 diabetes is the ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1 (*ENPP1*, *PC-1*). Its protein product inhibits the action of insulin on target cells. Acting on the tyrosine kinase activity of the  $\alpha$ -subunit, *ENPP1* prevents autophosphorylation of the insulin receptor and the subsequent formation of glucose transporter proteins. As a result, there is chronic hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance.

Thus, *ENPP1* genetic polymorphism is associated with impaired cyto-reception of the hormone which prevents the subsequent transmission of

insulin signals and can be used as a marker of type 2 diabetes. In the Ukrainian population, no work has been done to identify the influence of polymorphic variants of the *ENPP1* gene on the development of type 2 diabetes. This prompted us to conduct our own research.

### **Clinical Material Characteristics**

The study used venous blood from 317 patients with type 2 diabetes (51.1 % of women and 48.9 % of men, average age of  $(64.9 \pm 8.2)$  years), and 302 individuals (45.7 % of women and 54.3 % of men, average age of  $(65.1 \pm 14.5)$  years) who comprised the control group. The diagnosis in the examined patients was determined / confirmed on the basis of medical history, clinical and biochemical research methods (clinical analysis of blood and urine, definition of fasting blood glucose, glycemic profile and glycosylated hemoglobin) according to WHO recommendations. The study did not include patients with acute or chronic inflammatory processes in the acute stage, cancer and systemic diseases, severe renal and hepatic failure, trauma or major surgery, as well as individuals receiving medications that could potentially affect blood glucose levels. The control group consisted of individuals without diabetes. The absence of diabetes mellitus and other multifactorial diseases was confirmed by collecting anamnestic data, determining fasting blood glucose, ECG recording, blood pressure measurement as well as clinical and biochemical studies.

The study was performed abiding the World Medical Association Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects and approved by the Bioethics Commission of the Medical Institute of Sumy State University. Prior to inclusion in the study, all participants gave written consent for the use of blood in genetic testing.

### **Research Methods**

Isolation of genomic DNA was performed using a commercial kit Diatom DNA Prep 100 (LLC Isogen Laboratory, Russia), followed by molecular genetic study of polymorphic variants of the *ENPP1* gene.

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 (PCR-RFLP) in the thermal cycler GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA). Primers synthesized by Metabion (Germany) and enzymes (Taq polymerase and restriction enzyme) by ThermoFisher Scientific (USA) were used to amplify regions of this gene. The reaction mix, volume 25 µl, contained 50–100 ng of DNA, 5 µl of 5-fold PCR buffer, 1.5 mM magnesium sulfate, 200 µM of four nucleotide triphosphates mixture, 20 pM each of the primers and 0.5 IU Taq polymerase. PCR modes consisted of 35 cycles. The obtained amplification product (6 µl) for restriction analysis of the rs997509 polymorphism of the *ENPP1* gene was incubated at 37°C for 16 hours with 2 IU of restriction enzyme *Ssi*I (*Aci*I) (Thermo Scientific, USA) in buffer O. The analysis results were evaluated as follows: if cytosine was found in 43822nd position of the *ENPP1* gene, the amplifier (475 base pairs) was cleaved by restriction enzyme *Ssi*I into two fragments, i. e. 223 and 252 base pairs; if cytosine was replaced with thymine, the restriction site for *Ssi*I was absent and one fragment of 475 base pairs was found in the mix.

For the restriction analysis of the rs1044498 polymorphism of the *ENPP1* gene, the amplification product (6 µl) was incubated at 37°C for 18 hours with 5 IU of *Eco*47I (*Ava*II) restriction enzyme (Thermo Scientific, USA) in buffer R. If the 43213rd position of the *ENPP1* gene contained cytosine, an amplifier consisting of 238 base pairs was cleaved by *Eco*47I restriction enzyme into two fragments, i. e. 148 and 90 base pairs. When cytosine was replaced by adenine, the restriction site for *Eco*47I was lost and a single fragment of 238 base pairs was formed.

The amplifiers of the studied fragments were separated in a 2.5 % agarose gel containing ethidium bromide. Horizontal electrophoresis (0.1 A; 140 V) is

performed for 30 minutes. DNA visualization after electrophoresis is carried out using a transilluminator (Biocom, Russia).

Statistical analysis was performed using the SPSS-17 program. The difference in genotype distribution was revised using Pearson  $\chi$ -squared test. To determine the risk of developing type 2 diabetes, depending on the patient's genotype, binary logistic regression was used to calculate the odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (CI) for possible inheritance patterns. Arlequin software (version 3.1) was used to calculate haplotypes frequency and to analyze linkage disequilibrium (LD). 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.

### **Results of Own Research**

The determined frequencies of minor alleles for *ENPP1* gene polymorphic variants in individuals without type 2 diabetes are in accordance with most European populations and are 0.18 for rs1044498 polymorphism and 0.03 for rs997509 polymorphism. The *ENPP1* gene rs997509 polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the Ukrainian population. Carriers of the minor T-allele have a 2-times higher risk of developing type 2 diabetes than homozygotes for the major C-allele. The *ENPP1* gene rs1044498 polymorphism is also 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 there is a significant difference in the distribution of genotypes by rs997509 and rs1044498 polymorphic variants of the *ENPP1* gene among women

with type 2 diabetes and individuals in the control group. It was discovered 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 ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1 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 ( $OR = 3.230$ ;  $P = 0.023$ ).

Analysis of the combined effect of polymorphic gene sites of the ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1 and known risk factors for type 2 diabetes made it possible to create a classification model that includes the studied polymorphic sites of the *ENPP1* gene and body mass index (prognostic significance 57 % according to MDR method,  $P < 0001$ ). The combination in one individual with a  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  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*.

## **PUBLICATIONS LIST OF THE APPLICANT**

1. Marchenko I. V., Dubovik E. I., Tkach G. F. et al. Association of rs997509-polymorphism of the *ENPP1* gene with the development of type 2



diabetes mellitus in the Ukrainian population // *Wiadomości Lekarskie* - 2018, V. 71. - No. 3 (1). - P. 490-495.

2. Marchenko I. V., Dubovik E. I., Matlai O. I. et al. Analysis of the association of the K121Q polymorphism of the ENPP1 gene with risk factors for the development of type 2 diabetes mellitus in the Ukrainian population // *Wiadomości Lekarskie*. - 2018. - T. 71. - No. 4. - P. 815-820.

3. Marchenko I. V. Analysis of polymorphisms in rs997509 and rs1044498 of the ENPP1 gene with the development of type 2 diabetes mellitus // *Journal of Clinical and Experimental Medical Dosages*. - 2018. - No. 6, no. 2. - P. 278–284.

4. Marchenko I. V., Garbuzova E. A., Dubovik E. I., Chumachenko Y.D. Analysis of the association rs997509 to the polymorphism of the ENPP1 gene in type 2 diabetics in obese patients // *J. Clin. Exp. Med. Res.* - 2018. - No. 6 (1). - P. 170-175.

5. Marchenko I. V. Analysis of the link between rs997509-polymorphism of the ENPP1 gene with the action factors of rhizic diabetes type 2 // *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports*. - 2018. - T.3, No. 5. - P. 115-119.

6. Marchenko I. V., Garbuzova V. Yu., Dubovik E. I. Linkage of different variants to the genotype of polymorphisms rs1044498 and rs997509 of the ENPP1 gene with indicators of carbohydrate and lipid metabolism in patients with CD type 2. // *Bukovynsky medical visnik*. - 2018. - T. 22. - No. 2 (86). - P. 41-46.

7. I.V. Marchenko. Utility model patent 131229 U Ukraine, IPC G01N 33/573 (2006.01). Methods for predicting the development of type 2 sugar diabetes / I.V. Marchenko, V.Yu. Garbuzov, A.I. Dubovik, O.V. Ataman (Ukraine); applicant that patent holder Sumskiy ded. un-t. - No. u201807131; declared 06/25/2018; publ. 10.01.2019, bul. No. 1.

8. Marchenko I. V. Association of rs997509 to polymorphism of the ENPP1 gene in children with type 2 diabetes in children with a child's index // Proceedings of the XXII International Medical Congress of Students and Young Scientists, Ternopil, April 23-25, 2018. - P. 267.

9. Marchenko I. V. Association of rs997509 to the polymorphism of the ENPP1 gene with the development of type 2 diabetes in the Ukrainian population. // Materials of the *All-Ukrainian scientific-practical conference "Actual nutrition of modern medicine and pharmacy"* (until the 50th day of sleep at the ZDMU), Zaporizhzhia, Ukraine, 17-18 May 2018. - P. 19.

10. Marchenko I. V., Garbuzova V. Yu., Ataman O. V. Analysis of the link between rs997509-polymorphism of the ENPP1 gene in type 2 diabetes in particular children // Materials of the *Science Conference "XVII Reading V.V. Pidvisotsky"*, Odessa, Ukraine, 24-25 May 2018. - P.29.

11. Grybova I. V., Garbuzova V. Yu., Obukhova O. A. Comparative analysis of the distribution of K121Q polymorphic variants of the ENPP1 gene in patients with type 2 diabetes mellitus from different populations // Materials of the *Republican Scientific and Practical Conference "Metabolic Syndrome: Problems and Achievements"*, Tashkent, April 10, 2015. - P. 38-39.

12. Grybova I. V. Frequency of allelic variants of the gene ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) for polymorphism K121Q in patients with type 2 diabetes // Proceedings of the *XIX International Medical Congress of Students and Young Scientists*, Ternopil, Ukraine, April 27-29, 2015. - P. 281.

13. Grybova I. V., Garbuzova V. Yu., Obukhova O. A. Comparative analysis of the distribution of K121Q polymorphic variants of the ENPP1 gene in smokers and nonsmokers with type 2 diabetes // Materials of the *II International Scientific and Practical Conference "Science and Medicine: Modern View of Youth"*, Almaty, April 23-24, 2015. - P. 355-356.

14. 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 October 2015. - P. 103.

15. 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*. - 2016. - Barcelona - P. 188.

16. Marchenko I. V., Udovichenko B. Ya., Garbuzova V. Yu. Association of K121Q-polymorphism of the pyrophosphatase ectonucleotide / phosphodiesterase 1 (ENPP1) gene in patients with secondary diabetes mellitus of the 2nd arterial type // *Proceedings of the VII National Congress of Pathophysiologists of Ukraine with International Participation: Pathophysiology and Pharmacy: Ways of Integration* Kharkiv, October 5-7, 2016. - P. 153.

17. Marchenko I. V. Genetic and health officials as a factor of type 2 diabetes mellitus in children with children with genotype for K121Q polymorphism of the ENPP1 gene // *Proceedings of the XIV scientific-practical conference with international participation "Endocrine pathology in the age aspect"* Kharkiv, November 24-25, 2016. - P. 56–57.

18. Marchenko I. Analysis association of K121Q polymorphism ENPP1 gene from development of hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus // *Materials of the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference "Successful multidisciplinary education before diagnostics and development of diseases"* May 2017. - P.66. 19

19. Marchenko I. V., Obukhova O. A., Zarva A. O. Linkage to the K121Q polymorphism of the ENPP1 gene in type 2 CD ailments with indicators of carbohydrate and lipid metabolism // *Materials of the Science Conference "XVI-th readings of V.V. Podvysotsky"*, Odessa, 18-19 May 2017. - P.227.

20. Marchenko I. V. Relationship of K121Q polymorphism of the ENPP1 gene in patients with type 2 diabetes with indicators of glucose and glycosylated hemoglobin // Materials of the *Republican Scientific and Practical Conference "Metabolic syndrome and other categories of dismetabolism in various fields of medicine"* Tashkent, April 13, 2017 - P. 91.

## ЗМІСТ

С.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	22
ВСТУП .....	23
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури .....	30
1.1. Сучасні уявлення про патогенез та фактори ризику цукрового діабету 2-го типу .....	30
1.2. Ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та його роль у розвитку цукрового діабету 2-го типу .....	40
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження .....	51
2.1. Характеристика клінічного матеріалу .....	51
2.2. Молекулярно-генетичні дослідження .....	53
2.3. Методи статистичного аналізу .....	56
РОЗДІЛ 3. Результати власних досліджень .....	58
3.1. Зв'язок алельних поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена <i>ENPP1</i> із розвитком цукрового діабету 2-го типу .....	58
3.2. Асоціація rs997509 та rs1044498 поліморфних варіантів гена <i>ENPP1</i> із різними факторами ризику цукрового діабету 2-го типу .....	67
3.3. Поєднаний вплив одонуклеотидних поліморфізмів (rs997509 та rs1044498) гена <i>ENPP1</i> на розвиток цукрового діабету 2-го типу .....	86
РОЗДІЛ 4. Аналіз та узагальнення результатів дослідження .....	96
ВИСНОВКИ .....	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	115
ДОДАТКИ .....	141

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія.

АТ – артеріальний тиск.

АТФ – аденозинтрифосфат.

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота.

ЕКГ – електрокардіограма.

ІР – інсулінорезистентність.

ІМТ – індекс маси тіла.

РІ – рецептор інсуліну.

ЦД – цукровий діабет.

А – аденін.

С – цитозин.

СІ – довірчий інтервал.

ENPP1 – ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1.

G – гуанін.

GLUT – транспортер глюкози.

IR – інсуліновий рецептор.

IRS – субстрат інсулінового рецептора.

MDR – зменшення багатфакторної розмірності.

NO – оксид азоту.

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.

## ВСТУП

### Актуальність теми

Цукровий діабет 2-го типу без перебільшення займає одну з драматичних сторінок світової медицини як захворювання, пов'язане з високим рівнем людських та економічних втрат. За визначенням експертів ВООЗ, «цукровий діабет – проблема будь-якого віку і народів», що обумовлено його широкою географічною поширеністю, дуже швидким зростанням захворюваності, високою смертністю від його ускладнень, які постійно прогресують, істотно знижуючи якість життя і скорочуючи його тривалість. Останнім часом ця хвороба стала вивчатися як соціальна проблема, що стає все більш актуальною.

Згідно з даними Міжнародної федерації діабету (IDF), на цей час у світі зареєстровано 463 млн випадків цукрового діабету, 90 % із 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%. [1]. 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. Доведено, що у хворих, які страждають на ожиріння, зменшення маси тіла призводить до зниження вихідної концентрації глюкози та інсуліну у відповідь на вживання їжі [2]. У разі повернення хворих до надмірного харчування знову виникають гіперглікемія і гіперінсулінемія натщесерце, а також знижується секреція інсуліну у відповідь на приймання їжі.

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  $\beta$ -клітин [3, 4]. 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, нав 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 трохи знижену масу тіла, на ранніх стадіях захворювання має місце інсулінопенія [5].

Тому не дивно, що за останнє десятиріччя світова наукова література поповнилася великою кількістю праць, спрямованих на розкриття генетичної складової цукрового діабету 2-го типу. Зокрема, низкою праць, присвячених пошуку зв'язку поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів, що спричиняють дисфункцію  $\beta$ -клітин підшлункової залози, генів, що впливають на виникнення інсулінорезистентності, серед яких ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 із розвитком ЦД 2-го типу та факторами його ризику [6]. Проте дані, одержані різними вченими, мають популяційні відмінності й не завжди збігаються. В Україні праці, спрямовані на пошук асоціації однонуклеотидних 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) та «Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії» (державний реєстраційний номер 0117U003926) і 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 однонуклеотидних 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 однонуклеотидних 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 Т-алеля ризик розвитку ЦД 2-го типу в 2 рази вище, ніж у гомозигот за основним С-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 рази частіше, ніж гомозиготи за основним К-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 рази 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  $IMT \geq 25$   $kg/m^2$  носійства мінорного T-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів K/K, K/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 додатки.

## РОЗДІЛ 1.

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Сучасні уявлення про патогенез та фактори ризику цукрового діабету 2-го типу

Цукровий діабет 2-го типу – найпоширеніше ендокринне захворювання, що являє собою одну з найгостріших медико-соціальних проблем, оскільки призводить до ранньої інвалідизації та смертності серед населення внаслідок розвитку мікро- і макросудинних діабетичних ускладнень. Сьогодні, за даними IDF (International Diabetes Federation), 463 млн осіб у світі хворіють на цукровий діабет, з них 90 % – хворі з цукровим діабетом 2-го типу. В Україні зареєстровано більше ніж 2 млн випадків захворюваності на цукровий діабет. За частотою інвалідизації та смертності цукровий діабет займає 3-тє місце після серцево-судинних захворювань та онкопатології. Останніми роками цукровий діабет 2-го типу вважають «неінфекційною епідемією».

У цілому, ЦД 2-го типу розглядається як мультифакторіальне та полігенне захворювання. З генетичної точки зору ЦД 2-го типу – це складне захворювання, на генетичний ризик якого впливають спільні ефекти варіації на невизначену кількість геномних сайтів, деякі з переважанням схильності, а деякі із захисним ефектом до хвороби [7, 8]. Тобто етіологічний субстрат для цього захворювання – взаємодія генетичної схильності й способу життя людини.

ЦД 2-го типу має складний патогенез, що класично характеризується механізмом виникнення інсулінорезистентності та дисфункцією  $\beta$ -клітин підшлункової залози, внаслідок цього в крові й міжклітинній рідині постійно підвищується концентрація глюкози [9]. Глюкозотоксичність ініціює ряд патологічних процесів: підсилює вільнорадикальне окиснення; активує поліоловий шлях обміну глюкози, як наслідок, накопичення сорбітолу в клітинах і їх загибель; реакцію глікозилювання білків; оксидативний стрес

[10]. Точно назвати який із механізмів є первинним, а який – вторинним, досить складно. Все залежить від індивідуальних особливостей людини, але існує думка, що зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну передуює появі перших клінічних проявів у середньому на 15 років та є основною ланкою в патогенезі [11].

Інсулінорезистентність визначається як зниження чутливості периферичних тканин до дії інсуліну. Причиною її виникнення є порушення реалізації біологічної дії цього гормону, що може виникати на рівні інсулінового рецептора (IR), субстратів інсулінового рецептора (IRS) або внутрішньоклітинних сигнальних шляхів (PI3K- та MAPK-шляхи) [11. 12].

Отже, причиною розвитку ЦД 2-го типу є інсулінорезистентність, зниження кількості або афінності рецепторів клітин інсуліночутливих тканин. Накопичення глюкози і ліпідів призводить до зменшення щільності інсулінових рецепторів у жировій тканині, це сприяє розвитку гіперінсулінемії, що пригнічує розпад жирів, і прогресуванню ожиріння. Розвивається замкнене коло: IP → гіперінсулінемія → ожиріння → IP. Згодом гіперінсулінемія виснажує секреторний апарат β-клітин, що призводить до порушення толерантності до глюкози [13].

Порушення секреції інсуліну при ЦД 2-го типу мають кількісний і якісний характер. Раннім показником порушення секреторної функції β-клітин є втрата першої фази викиду інсуліну, яка відіграє важливу роль в метаболізмі глюкози. Пік секреції інсуліну викликає негайне припинення продукції глюкози печінкою, контролюючи рівень глікемії; пригнічує ліполіз і секрецію глюкагону; підвищує інсуліночутливість тканин, сприяючи утилізації ними глюкози. Втрата першої фази секреції інсуліну призводить до надлишкової продукції гормону в більш пізній час, погіршення контролю глікемії, гіперінсулінемії, що клінічно виявляється збільшенням маси тіла. Це супроводжується прогресуванням інсулінорезистентності, посиленням глюконеогенезу, зниженням утилізації глюкози тканинами, що в сукупності

призводить до гіперглікемії. Одночасно відбуваються зниження секреції інсуліну, індукованої глюкозою, порушення двофазної секреції цього гормону і перетворення проінсуліну на інсулін.

Тобто ключовими ланками патогенезу цукрового діабету 2-го типу є інсулінорезистентність, гіперглікемія і гіпоінсулінемія, якій передують гіперінсулінемія, внаслідок дії різноманітних ендогенних (генетичних) та екзогенних факторів, яка супроводжується порушенням усіх видів обміну речовин.

Виникнення ЦД 2-го типу пов'язане з дією багатьох факторів ризику, які умовно можна поділити на чотири групи: соціально-демографічні фактори ризику, фактори навколишнього середовища і способу життя, метаболічні фактори та генетичні фактори.

До соціально-демографічних факторів ризику цукрового діабету відносять: вік, стать, расову та етнічну належність і соціально-економічний статус.

До факторів навколишнього середовища та способу життя, що сприяють розвитку цукрового діабету 2-го типу, належать такі: харчування, гіподинамія, паління, вживання алкоголю, депресія та антидепресанти.

До метаболічних факторів, пов'язаних із ризиком цукрового діабету 2-го типу, відносять такі захворювання: ожиріння, гестаційний діабет в анамнезі, синдром полікістозних яєчників, а також компоненти метаболічного синдрому: збільшення окружності талії (центральний тип ожиріння), підвищений артеріальний тиск (АТ), збільшення плазмового рівня триацилгліцеролів (ТАГ) та зменшення ліпопротеїдів високої густини (ЛПВГ) [11, 14].

ЦД 2-го типу розвивається внаслідок інсулінорезистентності, що являє собою зниження чутливості тканин, в основному жирової, м'язової і тканини печінки, до дії інсуліну [15]. Причиною цього може бути генетична



схильність, проте найчастіше інсулінорезистентність виявляється в осіб з ожирінням [16].

Велика кількість наукових досліджень спрямована на вивчення негативного впливу ожиріння і надмірної маси тіла на чутливість до інсуліну. Цей вплив обумовлений низкою факторів, серед яких важливу роль відіграє збільшення потреби в інсуліні внаслідок збільшення маси жирової тканини [17], а також дією речовин, надлишок яких характерний для ожиріння. До останніх відносять тригліцериди, вільні жирні кислоти й такі адіпокіни, як резистин, фактор некрозу пухлин- $\alpha$ , інтерлейкін-6, адипонектин [18].

Тригліцериди є негормональними антагоністами інсуліну. Також їх вплив на інсулінорезистентність полягає в порушенні роботи і зниженні кількості переносників глюкози GLUT4. Надлишок вільних жирних кислот призводить до активації глюконеогенезу, пригнічення процесів транспорту і фосфорилування глюкози, а також до порушення передавання сигналу інсуліну в скелетних м'язах. Також жирні кислоти виявляють ліпотоксичний ефект на підшлункову залозу [19].

Резистин пригнічує ліпогенез, зменшує здатність інсуліну пригнічувати глюконеогенез у печінці [20], а також спричиняє експресію маркерів запалення в гіпоталамусі [21].

Фактор некрозу пухлин- $\alpha$  секретується макрофагами, інфільтрованими в жировій тканині. Він знижує чутливість жирової тканини до інсуліну і сповільнює проведення інсулінового сигналу [22]. Крім того, гальмує експресію гена-транспортера *GLUT4* і пригнічує секрецію адипонектину, а також стимулює ліпогенез, зростання адипоцитів та синтез жирних кислот [23].

Інтерлейкін-6 є протизапальним цитокином. Він сприяє глікогенолізу, знижує чутливість до інсуліну жирової тканини і тканини печінки [24], а також стимулює ліполіз та пригнічує секрецію адипонектину.

Концентрація адипонектину на відміну від попередніх адипокінів у разі інсулінорезистентності знижується. Він стимулює фосфорилування рецептора інсуліну за тирозином, тим самим підвищуючи чутливість до інсуліну скелетної, м'язової і печінкової тканин [25]. Крім того, адипонектин знижує надходження жирних кислот у печінку, стимулює їх окиснення шляхом активації протеїнкінази, а також пригнічує глюконеогенез і синтез ліпопротеїдів дуже низької щільності [26].

На особливу увагу заслуговує лептин. Основною функцією цього адипокіну є запобігання розвитку ожиріння. Він формує відчуття насичення, впливаючи на клітини дугоподібного ядра гіпоталамуса [27]. Крім того, лептин активує синтез анорексигенних пептидів [28], активує ліполіз і термогенез, зменшує розміри адипоцитів, а також відіграє важливу роль у запобіганні накопиченню тригліцеридів поза жировою тканиною. У нормі лептин перешкоджає зниженню чутливості до інсуліну [29]. Однак у разі інсулінорезистентності часто спостерігається підвищена концентрація цього адипокіну, що пояснюється резистентністю до нього. Лептин є сполучною ланкою між адипоцитами і  $\beta$ -клітинами підшлункової залози, стимулюючи секрецію інсуліну [30]. Також він бере участь у регуляції обміну глюкози та жирів, активуючи фермент АМФ-кіназу і пригнічуючи ацетил-СоА-карбоксілазу, стеароїл-СоА-десатуразу-1 і синтетазу жирних кислот. АМФ-кіназа відіграє важливу роль у підвищенні чутливості до інсуліну. [31]. Вона стимулює проведення інсулінового сигналу, впливаючи на особливий механізм інгібування субстрату IRS. Інгібітор mTOR (mammalian target of rapamycin) фосфорилує IRS за серином, знижуючи його активність. Сам mTOR активується TSC, на який і спрямовано інгібуючу дію АМФ-кінази. Таким чином, унаслідок її дії mTOR залишається в неактивному стані і ніщо не перешкоджає проведенню інсулінового сигналу. Крім того, АМФ-кіназа сприяє зниженню концентрації глюкози в крові. Вона пригнічує глюконеогенез й активує транспорт глюкози в клітини, гліколіз у м'язах і

печінці, а також процеси катаболізму, синтез АТФ і та окиснення жирних кислот.

Існує достатня кількість доказів того, що біла жирова тканина має імуномодельючі властивості. До її складу входять клітини імунної системи, не властиві за своїм розподілом та функціями іншим тканинам організму, серед яких важливу роль у розвитку інсулінорезистентності відіграє співвідношення між М1-прозапальними та М2-протизапальними макрофагами (М1/М2) [32]. Для пояснення цього зв'язку сьогодні послуговуються концепцією «хронічного запального процесу низької інтенсивності» («Chronic and low grade inflammation») [12, 14].

В умовах нормального метаболізму протизапальні М2-макрофаги (меншою мірою Treg та iNKT) продукують ІЛ-10, що підтримує чутливість адипоцитів до інсуліну та має протизапальні властивості [32]. Проте в результаті надмірного ліпідного навантаження на жирову тканину, розвитку ліпотоксичності та гіпоксії виникає низка змін, передусім пов'язаних зі зміною продукованого спектра цитокінів. Установлено, що адипоцити вивільнюють прозапальні цитокіни TNF $\alpha$ , ІЛ-6, MCP1/C/CL2 та резистин із відповідним зниженням утворення протизапальних адипокінів (адипонектину, SFRP5, васпіну та оментину-1) [32, 33]. Це призводить до кількісних та фенотипічних змін оточуючих резидентних лейкоцитів, зокрема, змінюється співвідношення М1/М2 на користь активованих прозапальних М1-макрофагів. Унаслідок цього, концентрація ІЛ-10, необхідного для підтримання імунологічної толерантності та чутливості адипоцитів до інсуліну, знижується. У той самий час під впливом TNF $\alpha$  через ІК/К  $\beta$ /NF- $\kappa$ B- та JNK-AP1-сигнальні шляхи активуються протеїнкінази ІК/К  $\beta$  та JNK, які фосфорилують серинові залишки IRS-1 адипоцитів (Ser-307, Ser-270 та Ser-312 відповідно), що призводить до порушення інсулінової сигналізації в цих клітинах. Таким чином, у жировій тканині

виникає інсулінорезистентність, пов'язана з розвитком місцевого запалення [14, 32, 33].

Подібний механізм порушення чутливості до інсуліну властивий і печінці. Унаслідок активного накопичення ліпідів гепатоцитами та активації клітин Купфера збільшується місцевий рівень прозапальних цитокінів. Тому, як і у випадку з жировою тканиною, в клітинах печінки активуються сигнальні шляхи запалення та пригнічується інсулінова сигналізація [14].

Важливим фактором виникнення інсулінорезистентності в жировій, скелетній м'язовій тканині та печінці є порушення функціонування субклітинних структур. Зокрема, повідомляється про залучення ендоплазматичного ретикулула (ЕПР) до активації прозапальних сигнальних шляхів в адипоцитах, гепатоцитах та міоцитах [14].

Результати нещодавніх досліджень свідчать про зв'язок між дефіцитом вітаміну D3 і ЦД 2-го типу [34]. Зв'язок дефіциту 25-ОН-D3 з порушеннями вуглеводного обміну підтверджується у багатьох працях. За даними метааналізу епідеміологічних досліджень, проведеного А. G. Pittas et al. (2007), хворі, які мають найнижчий рівень кальцидіолу в крові, удвічі частіше хворіють на ЦД 2-го типу, ніж особи з нормальним умістом кальцидіолу [35]. Також S. Pilz et al. (2008) у своїй праці виявили, що особи зі споживанням вітаміну D3 менше ніж 160 МО/добу хворіють на ЦД 2-го типу вдвічі частіше, ніж ті, які споживають понад 510 МО/добу. Водночас збільшення добового споживання вітаміну D3 до 600–1200 МО супроводжується достовірним зниженням частоти розвитку ЦД 2-го типу на 18 % [36]. У подвійному сліпому рандомізованому дослідженні було продемонстровано, що в осіб із гіперглікемією натще на момент входження до дослідження 3-річне приймання 700 МО холекальциферолу і 500 мг кальцію на добу призводило до достовірного зниження рівня глюкози натще і зменшення ІР [37]. Аналогічні дані наводять Т. Takiishi et al. (2010), які виявили, що в разі ЦД 2-го типу вітамін D3 підвищує чутливість клітин до

інсуліну і знижує запалення в тканинах підшлункової залози [38]. Виявлено, що недостатність вітаміну D3 пов'язана з підвищенням таких маркерів запалення, як С-реактивний протеїн та ІЛ-10 [39]. У дослідженні А. Kalin et al. (2012) виявлено позитивну кореляцію між рівнем адипонектину і концентрацією вітаміну D3 у хворих із ЦД 2-го типу. Автори також установили, що вміст вітаміну D3 тісно пов'язаний із маркерами запалення і схильністю до ожиріння. На підставі цих даних зроблено висновок, що дефіцит вітаміну D3 посилює ІР при ЦД 2-го типу [40]. Аналогічні дані наведені в праці А. Bohdanowicz-Pawlak et al. (2012), вони встановили, що низький рівень вітаміну D3 корелює з високим умістом жирової тканини, ІЛ-6 і низьким рівнем адипонектину [41].

Окремо виділяють групу факторів ризику, пов'язану з генетичною схильністю. З молекулярно-генетичних позицій цукровий діабет 2-го типу вивчений недостатньо. Переважну кількість досліджень щодо ролі різних генів-кандидатів у формуванні ЦД 2-го типу та його ускладнень проведено за кордоном [42, 43, 44, 45,46].

Першим підтвердженням того, що сімейна схильність ЦД 2-го типу є результатом генетичного детермінування, були дослідження на близнюках та багатодітних сім'ях, проведені в другій половині ХХ століття.

За даними різних авторів, ризик розвитку ЦД 2-го типу, якщо один із батьків хворіє на ЦД, становить 35–39 %, якщо обидва батьки – 60–70 % [47, 48], у монозиготних близнюків ризик ЦД досягає 58–65%, у гетерозиготних – 16–30 % [49]. Свідченням генетичної основи ЦД 2-го типу є й дослідження, проведені на гібридних популяціях, де частота розвитку ЦД 2-го типу досягає 50 % (американські індіанці Піма, іспаномовні американці) або менше ніж 1 % (деякі африканські популяції й племена Мапуче або Аймара в Південній Америці) [50]. На сьогодні завдяки методу повногеномних асоціативних досліджень (GWAS) ідентифіковано велику кількість локусів, асоційованих із ЦД 2-го типу. Виявлені одонуклеотидні поліморфізми належать генам,

експресія яких визначає [51, 52] синтез інсуліну, функціонування  $\beta$ -клітин, кількість і чутливість інсулінових рецепторів, концентрацію глюкози в плазмі та розвиток ожиріння. На цей час налічується більше ніж 200 відомих генів-кандидатів у розвитку ЦД 2-го типу [53, 54]. Найбільш досліджені та вивчені за механізмому їх впливу на розвиток ЦД 2-го типу наведені в таблиці 1.1.1.

Таблиця 1.1.1. – Гени-кандидати в розвитку цукрового діабету 2-го типу (за С. Guja, P. Gagnius and С. Ionescu-Tîrgoviște, 2012)

Гени, що впливають на дисфункцію $\beta$ -клітин	Гени, що спричиняють інсулінорезистентність			
	Вуглеводний обмін	Ліпідний обмін	Дія інсуліну	Ожиріння
<i>HLA,</i> <i>Insulin,</i> <i>KATP – Kir6.2,</i> <i>HNF4a,</i> <i>Glucokinase,</i> <i>HNF1a,</i> <i>IPF-1,</i> <i>HNF1b,</i> <i>Wolframin,</i>	<i>GLUT1,</i> <i>GLUT2,</i> <i>GLUT4,</i> <i>Hexokinază,</i> <i>Glicogen</i> <i>Sinthase,</i> <i>Fospho-</i> <i>fructokinase,</i> <i>Adenosine</i> <i>Desaminase,</i> <i>GLP-1,</i> <i>Mitochondrial</i> <i>DNA</i>	<i>LPL,</i> <i>HSL,</i> <i>ApoAI Apo AII,</i> <i>ApoB,</i> <i>ApoE,</i> <i>PPARa,</i> <i>PPARg,</i> <i>Mitochondrial</i> <i>DNA</i>	<i>Insulin,</i> <i>IR,</i> <i>IRS 1, 2,</i> <i>PI3K,</i> <i>PKB,</i> <i>ENPPI</i>	<i>Leptin,</i> <i>Leptin</i> <i>Receptor,</i> <i>b3-AR,</i> <i>UCP1,</i> <i>UCP2 and</i> <i>UCP3,</i> <i>TNFa,</i> <i>PPARg,</i> <i>PPARGC1A,</i> <i>DRD2,</i> <i>Adiponectin,</i> <i>Resistin</i>

Примітка: *Kir* – Калієві канали внутрішнього випрямлення; *HNF* – ядерний фактор гепатоцитів; *GLUT* – транспортер глюкози; *GLP-1* – глюкагон, як пептид-1; *LPL* – ліпопротеїнова ліпаза; *HSL* – гормонально-чутлива ліпаза; *IR* – рецептор інсуліну; *IRS* – субстрат рецептора інсуліну; *PI3K* – фосфатидил-інозитол-3-кіназа; *PKB* – протеїнкіназа В; *ENPPI* – ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1; *b3-AR* –  $\beta$ 3-адренергічний рецептор; *UCP* – Uncoupling protein; *TNF* – фактор некрозу пухлини; *DRD2* – рецептор дофаміну; *PPARGC1A* – *PPAR* $\gamma$ - коактиватор 1A

Потенційною причиною інсулінорезистентності може стати мутація в гені будь-якого білка, який у ролі сигнальної молекули, ферменту, субстрату або фактора бере участь у процесі передавання інсулінового сигналу або опосередковує його гіпоглікемічну дію [55]. Основною ланкою в ланцюзі

передачі гормонального сигналу є рецептор до інсуліну. Він являє собою глікопротеїн-гетеродимер, субодиниці якого з'єднані дисульфідними містками. Його  $\alpha$ -субодиниці майже повністю розміщені на зовнішньому боці плазмолемі і пов'язують інсулін, а  $\beta$ -субодиниці розміщені трансмембранно, вони мають тирозинкіназну активність і беруть участь у передаванні гормонального сигналу шляхом фосфорилування субстрату інсулінового рецептора [56].

Виділяють п'ять груп мутацій інсулінового рецептора, що розрізняються за механізмом впливу. Залежно від цього мутації можуть призводити до зниження швидкості біосинтезу, дефектів посттрансляційної модифікації та внутрішньоклітинного транспорту, дефектів зв'язування з інсуліном, зниження тирозинкіназної активності, прискореного руйнування білка-рецептора [57].

Гіпоглікемічний ефект інсуліну реалізується за допомогою сигнального шляху Ras, що являє собою комплекс білків (GRB 2 – growth factor receptor bound protein 2, Ras-білок), які активують фактори (GAP – GTP-ase Activating Factor, GEF – GTP Exchange Factor, SOS – Son of Sevenless) і ферменти (Raf-1-кіназа, МАПК-кіназа, протеїнкіназа pp90S6, протеїн фосфатаза, глікогенсинтаза, кіназа глікогенфосфорилази та ін.), активація яких за каскадним принципом забезпечує основні процеси реалізації гіпоглікемічного ефекту інсуліну – стимуляцію синтезу глікогену і пригнічення глікогенолізу [58, 59]. На будь-якому етапі цього складного шляху може відбутися збій, обумовлений інгібуванням одного з перелічених ферментів або мутацією в його гені, що призводить до розвитку інсулінорезистентності [60].

Також інсулінорезистентність може бути опосередкована порушенням роботи транспортера глюкози GLUT4 [61]. Він являє собою трансмембранний білок, четвертинна структура якого містить 12 трансмембранних доменів, а N- і C-кінцеві частини розміщені всередині

цитоплазми [62]. Це єдиний інсулінозалежний переносник глюкози. Як було зазначено вище, він локалізується в клітинах скелетної та серцевої м'язової, а також жирової тканин і переносить глюкозу шляхом полегшеної дифузії [63]. За відсутності інсулінового сигналу GLUT4 розміщений у цитоплазмі, а в разі одержання цього сигналу – вбудовується в плазмолему. Порушення, що призводять до інсулінорезистентності, можливі на етапах передавання сигналу інсуліну про переміщення GLUT4 до плазматичної мембрани, його переміщення в цитоплазмі, включення до складу плазмолемі [64].

Необхідно зауважити, що одним із генів-кандидатів розвитку ЦД 2-го типу є ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), експресія якого гальмує дію інсуліну на циторцепторному рівні. Тому сьогодні відбувається активне дослідження зв'язку його одонуклеотидних поліморфізмів, зокрема rs997509 та rs1044498, із розвитком цього захворювання та його хронічних діабетичних ускладнень.

Таким чином, ЦД 2-го типу – це метаболічно-запальне захворювання, основними патогенетичними ланками якого є інсулінорезистентність та зниження секреції інсуліну, що виникають унаслідок поєднаної дії зовнішніх факторів (передусім ожиріння) та генетичної схильності (насамперед впливу одонуклеотидних поліморфізмів генів).

## **1.2. Ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та його роль у розвитку цукрового діабету 2-го типу**

Ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 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



[65]. ENPP1 – фермент, що має широку специфічність: виявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням неорганічного пірофосфату (PPi), фосфодіестеразну активність – шляхом утворення АМФ із цАМФ [66]. 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 [67]. Протеїн зазнає посттрансляційної модифікації у вигляді аутофосфорилування як частини каталітичного циклу в активуванні пірофосфатази/фосфодіестерази 1, а також глікозилування N-кінця.

Молекула білка ENPP1 складається з п'яти частин: внутрішньоклітинного домену (із N-кінцевою спіраллю), двох соматомедин-V-подібних доменів і двох каталітичних позаклітинних доменів (фосфодіестеразоподібного і нуклеазоподібного) [68, 69]. Внутрішньоклітинний домен містить аміногрупу і складається з 24–76 залишків. Більша частина домену знаходиться в мембрані, і лише незначна частина – в цитоплазмі. Це є специфічною особливістю трьох ферментів сімейства – ENPP1, ENPP2, ENPP3 – і відрізняє їх від інших членів, N-кінець яких розміщений поза клітиною [70].

Два багатих на цистеїн соматомедин-V-подібних (SMB-1 і SMB-2) домени довжиною 40–50 амінокислотних залишків розміщені між трансмембранним і каталітичним доменами. На думку Н. Zimmermann et al., таке розміщення SMB-доменів забезпечує стабілізацію молекули ENPP1 [71]. Свою каталітичну активність фермент виявляє у формі гомодимеру. Об'єднання відбувається за рахунок утворення дисульфідних містків між молекулами цистеїну SMB-доменів двох мономерів ENPP1 [72]. Необхідно зазначити, що досліджений K121Q-поліморфізм (rs1044498) міститься в домені SMB-2 білка ENPP1 [73]. Сьогодні не відомий можливий механізм

зв'язку заміни лізину (K) на глютамін (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. Фосфодіестеразна активність білка здійснюється шляхом утворення АМФ із цАМФ [74]. Нуклеазоподібний домен містить карбоксильну групу, спрямовану в позаклітинне середовище. Довжина цього домену приблизно 250 амінокислот [73, 74]. С. Stefan et al. довели, що каталітичні домени ENPP1 мишей мають високу ідентичність із людськими ізоформами (до 60 % амінокислот) [75].

Ira D. Goldfine et al. зазначають, що каталітичні домени забезпечують розщеплення глюкозофосфатних, фосфосульфатних, пірофосфатних і фосфодіестеразних зв'язків [76]. Автори зазначають, що активний центр ферменту пірофосфатази і фосфодіестерази містить залишок треоніну-204. Каталітична активність ENPP1 залежить від двовалентних катіонів та оптимальна за рН 9–10 [74].

Білок ENPP1 експресується в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, печінки, нирках, судинах, відіграючи важливу роль у функціонуванні вищезазначених органів і тканин [77–79]. Відомо, що ENPP1 є інгібітором інсулінових рецепторів. Взаємодіючи з  $\alpha$ -субодиницею рецептора, він пригнічує активність тирозинкінази, спричиняючи інсулінорезистентність. Miao-Pei Chen et al. зазначають, що рівень інсулінорезистентності залежить від активності *ENPP1* [80].

Ген *ENPP1* міститься на довгому плечі 6 (6q22–23q) хромосоми, має 25 екзонів і 24 інтрони [81, 82]. Регуляцію експресії гена ENPP1 контролює ціла низка регулювальних чинників, зокрема глюкокортикоїди [83], активатори протеїнкінази C [84], фактори росту фібробластів [85], цитокіни (IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ ) [86]. A. Abhishek і M. 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 [87]. На сьогодні відомо близько 2 тисяч однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена *ENPP1* людини. Найбільш дослідженими з яких є K121Q (rs1044498), IVSdelT-11 (rs1799774), A/G +1044TGA (rs7754561) [88, 89].

Ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1, PC-1) являє собою трансмембранний глікопротеїн II класу, розміщений як на плазматичній мембрані, так і в ендоплазматичному ретикулумі [90]. Уперше був описаний у 1970 р. у праці Т. Takahashi et al. [93]. ENPP1 людини належить до сімейства білків ектонуклеотидної пірофосфатази/фосфодіестерази (ENPP), які гідролізують пірофосфат або фосфодієфірні зв'язки в різних позаклітинних сполуках, таких як нуклеотиди та лізофосфоліпіди [90, 91]. Морфологічно білок складається з п'яти частин (рис.1.2.1.): короткого N-кінцевого внутрішньоклітинного домену, трансмембранного домену, двох соматомедин-В-подібних доменів, каталітичного та С-кінцевого нуклеазоподібного домену.

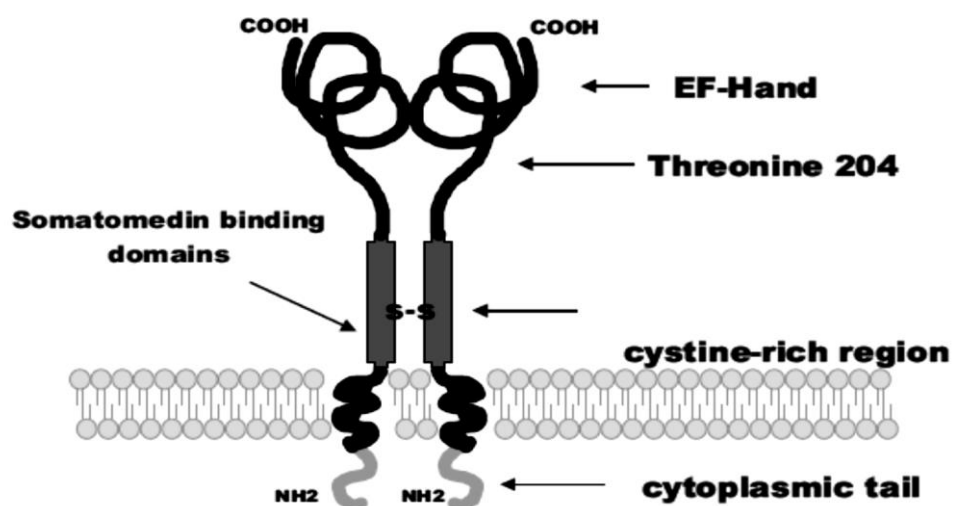


Рисунок 1.2.1. – Будова білка ENPP1 (за Ira D. Goldfine et al., 2008)

Відомо, що позаклітинний домен ENPP1 є найдовшим серед усіх представників роду ектонуклеотид пірофосфатаз/фосфодіестераз. Так, людський та мишачий цитоплазматичні домени ENPP1 різні за довжиною і становлять 76 та 58 амінокислот, в той час як ENPP2 та ENPP3 – 10 та 22 амінокислоти відповідно [94].

Позаклітинний домен молекули ENPP1 складається з двох соматомедин-В-подібних доменів (SMB, довжина – 40-50 амінокислотних залишків), що містять багато цистеїну та подібні до доменів соматомедину-В вітронектину, і двох каталітичних – С-кінцевого нуклеазоподібного (структурно подібний до ДНК- або РНК-неспецифічних ендонуклеаз, довжина становить 250 амінокислот) та фосфодіестеразоподібного домену (містить приблизно 400 амінокислот).

Соматомедин-В-подібні субодиниці розміщені проксимальніше до плазматичної мембрани і є зв'язком між трансмембранним та каталітичним доменами. Дослідження показали, що ця частина молекули є важливою для повноцінного формування протеїну (видалення їх сприяло утриманню та накопиченню ENPP1 в ендоплазматичному ретикулумі).

Внутрішньоклітинний домен (24–76 амінокислотних залишків) майже повністю занурений у мембрану і лише маленька його частина знаходиться у цитоплазмі клітини.

Активний сайт каталітичного домену пов'язаний з двома іонами цинку. Перший розташований у Asp 358, His 326 і His 512, другий – в Asp 200, Thr 405 і His 406 відповідно. Функціональна значущість іонів цинку полягає в тому, що між ними зв'язується  $\alpha$ -фосфатна група АТФ, і стає можливим подальший її гідроліз [95].

Нуклеазоподібний домен містить з'єднані з бічними ланцюгами (Asp780, Asp782, Asp784 та Asp784) та з карбонільною групою (Arg 786) основних ланцюгів іони кальцію, що формують EF-hand. Каталітичні домени білка забезпечують розщеплення глюкозофосфатних, фосфосульфатних,

пірофосфатних і фосфодіестеразних зв'язків, причому активний центр ферменту пірофосфатази і фосфодіестерази містить залишок треоніну-204 [97].

Білок зазнає посттрансляційної модифікації шляхом аутофосфорилування як частини каталітичного циклу в активуванні пірофосфатази/фосфодіестерази 1, а також глікозилування N-кінця (протеїн глікозильований в Asn 267, Asn 323 та Asn 567).

ENPP1 являє собою гомодимер з молекулярною масою 115–135 кДа, залежно від типу клітини [92]. ENPP1 кодується однойменним геном, що розміщений на довгому плечі 6-ї хромосоми (6q22-23q) та містить інформацію про 925 амінокислотних залишків, 1–76-й кодують цитоплазматичний домен, 77–97-й – трансмембранний домен і 98–925-й амінокислотні залишки – позаклітинний домен.

Складається з 25 екзонів, розділених 24 інтронами, з яких 7-м екзоном кодується активний сайт каталітичного домену. Ген займає приблизно 83 kb геномної ДНК, а його довжина становить приблизно 87140 пар азотистих основ [96].

Експресія гена відбувається в різних тканинах, включаючи печінку, скелетні м'язи та жирову тканину, серце, мозок, нирки, плаценту, панкреатичні островці, нирки, легені, хондроцити, лімфоцити та фібробласти [93]. Регулюється за допомогою багатьох чинників, таких як цитокіни, глюкокортикоїди, активатори протеїнази С, фактори росту фібробластів. Відомо, що підвищення експресії *ENPP1* відбувається під впливом трансформуючого фактора росту- $\beta$ , в той час як інсуліноподібний фактор росту 1 та цитокіни зменшують його експресію [98].

Фізіологічна функція ENPP1 неповністю зрозуміла. Є дані про його антикальциногенну дію. Він є масивним інгібітором кальцифікації за рахунок здатності підвищувати рівень неорганічного пірофосфату ( $PP_i$ ) у позаклітинному просторі. Також відомо, що утворений  $PP_i$ , відповідає за

диференціацію клітин і є фізіологічним інгібітором осадження гідроксіапатиту шляхом зв'язування з його кристалами [96]. Таким чином, фермент регулює кальцифікацію м'яких тканин та мінералізацію кісткової тканини. Експериментально доведено, що миші з інактивованим мутантним алелем мають надмірну кальцифікацію суглобів [95]. Мутації *ENPP1* також спричиняють кальцифікацію кров'яних судин у мишей та людей [95, 99, 100]. *ENPP1* бере участь у диференціації адипоцитів і відіграє певну роль в обміні вуглеводів. Збільшення експресії *ENPP1* інгібує активність тирозинкінази інсулінового рецептора [101, 102] і спричиняє резистентність до інсуліну [101, 103, 104]. Кілька досліджень продемонстрували дію *ENPP1* *in vitro* та *in vivo*. Збільшення експресії *ENPP1* інгібує сигналізацію інсуліну в декількох типах клітин *in vitro* і тісно пов'язаний із рецептором інсуліну на поверхні клітини [102, 105, 106].

Ген *ENPP1* сприяє розвитку цукрового діабету 2-го типу за рахунок впливу на тирозинкіназну активність  $\alpha$ -субодиниці рецептора інсуліну, що призводить до інсулінорезистентності. По-перше, експресія *ENPP1* виражена в тканинах, чутливих до інсуліну, таких як печінка, скелетні м'язи і жирова тканина, а також фібробластах та інших тканинах пацієнтів з інсулінорезистентністю [107, 108]. По-друге, надекспресія *ENPP1* у культивованих клітинах викликає в них меншу чутливість до інсуліну [112]. По-третє, у трансгенних тваринах із вираженою експресією *ENPP1* у різних тканинах у результаті експерименту розвиваються інсулінорезистентність та цукровий діабет 2-го типу [109]. По-четверте, поліморфний варіант rs1044498 гена *ENPP1* виявляє посилений інгібуючий ефект на рецептор інсуліну і клінічно пов'язаний з інсулінорезистентністю [110].

Дослідження ролі *ENPP1* у розвитку інсулінорезистентності почалися тоді, коли вперше у 42-річної жінки з ЦД 2-го типу одержали культивовані фібробласти [111, 112]. В її клітинах передавання інсулінового сигналу було погіршеним унаслідок порушення аутофосфорилування рецептору інсуліну,

фосфорилування IRS-1 та біологічних функцій, включаючи транспорт глюкози й амінокислот. В інших експериментах трансфекція фібробластів мишей геном *ENPP1* викликала 5-кратне збільшення цього гена та порушення діяльності тирозинкіназної активності рецептора інсуліну. *Abate et al.* отримали аналогічні результати [113]. У дослідженнях *Maddux et al.* експресія *ENPP1* була підвищена у фібробластах інсулінорезистентних осіб та в пацієнтів із ЦД 2-го типу, що пов'язано зі зниженням активності кінази PI [112]. Подібні результати у своїх дослідженнях фібробластів пацієнтів із ЦД 2-го типу одержали *Teno et al.* [114]. Експериментально доведено, що генетично модифіковані миші з надмірною експресією *ENPP1* у клітинах печінки та скелетних м'язах демонструють високий рівень глюкози й інсуліну, менш виражена в них толерантність до глюкози, а також знижується поглинання глюкози в м'язах [115]. У подальших дослідженнях підтверджується шкідливий вплив посиленої експресії *ENPP1* на рецептор інсуліну [102, 116, 117, 118]. Тобто при ЦД 2-го типу спостерігається порушення активації інсулінового рецептора, що порушує аутофосфорилування PI, як наслідок, припинення подальшого каскаду реакцій, необхідних для дії інсуліну. Щоб зрозуміти механізм впливу *ENPP1* на виникнення інсулінорезистентності, необхідно розглянути структуру молекули рецептора інсуліну (рис. 1.2.2).

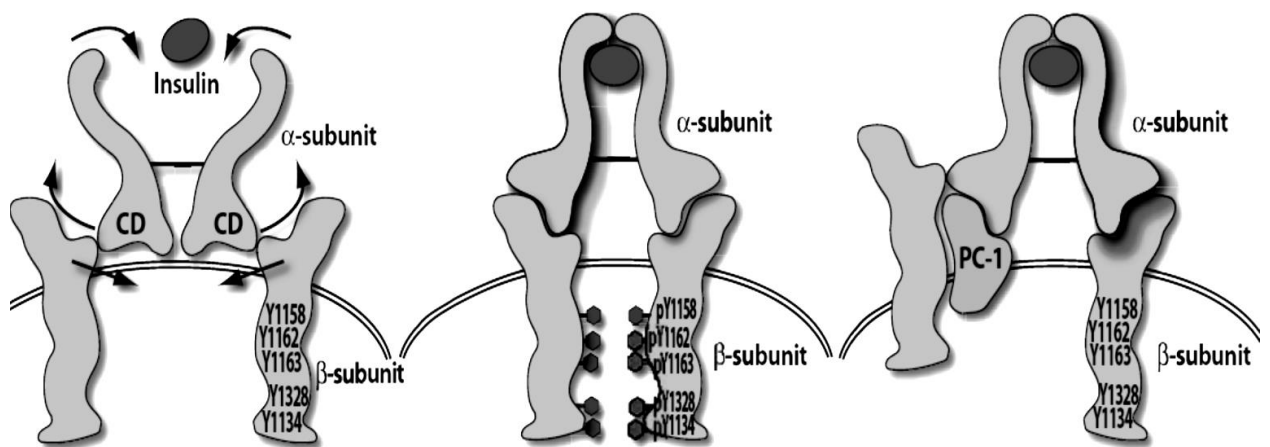


Рис.1.2.2 – Механізм впливу *ENPP1* на виникнення інсулінорезистентності. (Derived from C. C. Yip and P. Ottensmeyer: *Biol. Chem.* 278:27329–27332, 2003)

У нормі зв'язування інсуліну з його рецептором призводить до широкого спектра клітинних реакцій. Рецептор виконує три основні функції: 1) з високою специфічністю розпізнає в молекулі місця зв'язування інсуліну і здійснює комплексування з останнім за допомогою  $\alpha$ -субодиниці; 2) опосередковує передавання відповідного сигналу, спрямованого на активацію внутрішньоклітинних процесів, шляхом конформаційних змін та активації тирозинкінази  $\beta$ -субодиниці; 3) здійснює ендоцитоз гормонорецепторного комплексу, що призводить до лізосомального протеолізу інсуліну з одночасним поверненням субодиниці до мембрани клітини.

За допомогою електронної мікроскопії Yip et al. у Торонтському університеті отримали тривимірну модель РІ [119]. Найбільшу увагу привертає до себе з'єднувальний домен (CD) в  $\alpha$ -субодиниці РІ, який містить 485–599 амінокислотних залишків, де може взаємодіяти *ENPP1* (PC-1). CD, швидше за все, є шарнірною ділянкою, що зв'язує ділянку ліганд до домену тирозинкінази  $\alpha$ -субодиниці. Таким чином, коли інсулін зв'язується з  $\alpha$ -субодиницею, CD передає конформаційну зміну до рецептора інсуліну, яка активізує домен тирозинкінази  $\beta$ -субодиниці шляхом аутофосфорилування. Ця модель також пояснює, чому видалення CD виробляє рецептор, який усе ще зв'язує інсулін, але не виявляє тирозинкіназної активності [120].

Інсулінорецепторна тирозинкіназна активність призводить до аутофосфорилування інсулінового рецептора і до фосфорилування інших клітинних субстратів. Це так звані білки-субстрати інсулінового рецептора, insulin receptor substrates (IRS), які відіграють важливу роль у передаванні дії інсуліну [121]. Субстрати інсулінового рецептора виконують з'єднувальну функцію між інсуліновим рецептором та іншими внутрішньоклітинними субстратами, такими як, наприклад, фосфоінозитид-3-кіназа (PI-3-кіназа). У разі стимуляції інсуліном PI-3-кіназа перетворює фосфоінозитол (PI)-4 або PI-4,5-фосфат на PI-3,4 або PI-3,4,5-фосфат. PI-3,4,5-фосфат за допомогою



PI-3-кінази забезпечує адапторну ділянку для PH-домену серин/треонін специфічної протеїнкінази В (PKB) і фосфоліпід-залежної кінази (PDK 1 і PDK 2) [122]. PKB, ймовірно, залучена до цілого ряду тканинних ефектів інсуліну, включаючи стимуляцію поглинання глюкози, гліколізу, синтезу глікогену і білка. Наприклад, PKB стимулює переміщення везикул GLUT-4 до цитоплазматичної мембрани [123]. Після утворення вторинного месенджера активується транспорт глюкози. Це відбувається за допомогою транспортерів глюкози (GLUT) – білків, що розміщені на внутрішній поверхні клітинних мембран і забезпечують перенесення глюкози всередину клітини. Як тільки глюкоза транспортувалася в клітину, ініціюється ряд механізмів внутрішньоклітинного метаболізму глюкози. Глюкоза фосфорилується глюкокіназою [124] і гексокіназою [125] і потім метаболізується двома шляхами: синтезом глікогену [126] та гліколізом [127]. Відбуваються ці процеси за участі ферментів, що перебувають під контролем інсуліну.

На сьогодні відомо понад 2 тис. одонуклеотидних поліморфізмів *ENPP1*. Найбільш дослідженим є поліморфізм rs1044498 (K121Q) [128]. Суть цього алельного поліморфізму полягає в заміні азотистої основи аденіну на цитозин у 4-му екзоні (43213-те положення гена), що призводить до заміни амінокислоти лізину на глутамін у 121-му положенні білка (мутація відбувається в послідовності амінокислот соматомедин-В-подібного домену білка) [100, 129, 130]. Найчастіше цей поліморфізм асоціюється з виникненням серцево-судинних захворювань [130], інсулінорезистентності [131], ожирінням [132] зокрема й ожирінням у дітей [133] та цукровим діабетом 2-го типу [134]. Було доведено зв'язок цього поліморфізму з розвитком ЦД 2-го типу в різних популяціях і показано, що носії мінорного алеля K/Q + Q/Q мають більшу схильність до розвитку цього захворювання. Зв'язок поліморфізму 4-го екзона з виникненням ЦД 2-го типу доведений для більшості представників європеїдної, африканської та азійських рас [135].

На сьогодні вивчається зв'язок цього поліморфізму з ускладненнями, що виникають при цукровому діабеті, зокрема ожирінням [136], гострим коронарним синдромом [129], діабетичною нефропатією [137] та ін. Останнім часом активно вивчається поліморфізм 1-го інтрона гена *ENPP1* – rs997509. Суть цього поліморфізму полягає у заміні цитозину на тимін у 43822-му положенні гена. Доведена його асоціація з ожирінням [138] і цукровим діабетом 2-го типу [139] у південно-африканській популяції, метаболічним синдромом – у мешканців Італії [128], та ожирінням і цукровим діабетом 2-го типу – в поляків [140].

Таким чином, враховуючи важливу роль інсулінорезистентності в розвитку ЦД 2-го типу та потенційну асоціацію генетичного поліморфізму *ENPP1* із розвитком метаболічних порушень серед населення багатьох країн, можемо припустити можливість наявності зв'язку rs997509- і rs1044498-поліморфних локусів цього гена з розвитком ЦД 2-го типу серед представників української популяції.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. 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 із середнім віком  $(65,1 \pm 14,5)$  роки), які становили контрольну групу. Пацієнтів із ЦД 2-го типу було відібрано в Сумській обласній клінічній лікарні, Сумській міській клінічній лікарні № 5 і Тростянецькій районній лікарні. 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 становили 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 в генетичних дослідженнях.

Порівняльна клінічна характеристика пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу та осіб контрольної групи наведена в таблиці 2.1.1.

**Таблиця 2.1.1 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів у групах порівняння**

Показник	ЦД 2-го типу (n = 317)	Контроль (n = 302)	P
Вік, років	64,9 ± 8,2	65,1 ± 14,5	0,898
Стать, 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 сист., мм рт. ст.	147,5 ± 19,9	141,9 ± 23,2	0,001
АТ діаст., мм рт. ст.	89,2 ± 10,5	84,1 ± 10,7	< 0,001
Глюкоза натще, ммоль/л	9,41 ± 3,1	5,25 ± 0,8	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> , %	8,48 ± 2,6	4,27 ± 1,3	< 0,001
Загальний холестерол, ммоль/л	5,23 ± 1,37	4,89 ± 1,81	0,008
ХС-ЛПВГ, ммоль/л	0,98 ± 0,29	1,04 ± 0,39	0,029
ХС-ЛПНГ, ммоль/л	3,35 ± 1,32	3,09 ± 1,51	0,022
ХС-ЛПДНГ, 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 діаст. – діастолічний артеріальний тиск; HbA<sub>1c</sub> – глікозильований гемоглобін; ХС – холестерол; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини. Категоріальні змінні були порівняні з використанням  $\chi^2$ -тесту, кількісні змінні – за допомогою *t*-тесту.

## 2.2. Молекулярно-генетичні дослідження

Венозну кров як матеріал дослідження набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти як антикоагулянт («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ . Забір крові для досліджень проводили кваліфіковані спеціалісти в клінічних умовах із додержанням усіх правил медичної асептики та антисептики.

*Виділення геномної ДНК* із венозної крові проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія) згідно наступного протоколу:

1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл нерозведеної венозної крові та додати 400 мкл лізувального розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів.
2. Термостатування суміші – 5 хв за температури  $65^{\circ}\text{C}$ .
3. Центрифугування пробірок – упродовж 10 с при 5 000 об/хв та додавання 20 мкл ретельно збовтаної на вортексі суспензії сорбенту NucleoS<sup>TM</sup>.
4. Перемішування проб упродовж 10 хвилин.
5. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту.
6. Додавання 200 мкл лізувального розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану.
7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів.
8. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК.
9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану.
10. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК.
11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу.
12. Висушування осаду при температурі  $65^{\circ}\text{C}$  впродовж 5 хв.
13. Додавання до пробірки 50 мкл ЕкстраГену<sup>TM</sup> за постійного перемішування останнього розчину.
14. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання

гомогенної суспензії і термостатування за температури 65 °С впродовж 5 хв. 15. Суспензування вмісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв. 16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання за температури –20<sup>0</sup>С.

Ампліфікація. Визначення алельного поліморфізму 1-го інтрона (rs997509) та 4-го екзона (rs1044498) гена *ENPP1* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) у термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікацію ділянок зазначеного гена, що складалася з 35 циклів, проводили за допомогою пари специфічних праймерів, що наведено в таблиці 2.2.1).

Таблиця 2.2.1 – **Режими ампліфікації**

Поліморфізм	Нуклеотидна послідовність праймерів	Режим ампліфікації		
		D	H	E
<b>rs997509</b>	Fwd: 5' CTACCAATATGGGCCACTGAT 3' Rev: 5' CTGGACCAAGTGTACCACAAA 3'	94 °C (50 с)	64 °C (40 с)	72 °C (1 хв)
<b>rs1044498</b>	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

Використовували праймери, синтезовані фірмою «Metabion» (Німеччина). Суміш для ампліфікації складалася з 50–100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфату магнію, 150 мкМ суміші чотирьох нуклеозидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази («Thermo Scientific», США). Обсяг суміші доводили до 25 мкл деіонізованою водою.

*Рестрикційний аналіз поліморфізму rs997509 гена ENPP1.*

Отриманий продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували за температури 37 °С впродовж 16 годин із 2 ОД рестриктази *SsiI* (*AciI*) («Thermo Scientific»,

США) в буфері О такого 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 оцінювали таким чином: якщо в 43822-й позиції гена *ENPP1* містився цитозин, ампліфікат (475 пар основ) розщеплювався рестриктазою *SsiI* на два фрагменти – 223 і 252 пари основ; у разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для *SsiI* був відсутній, і в суміші виявлявся один фрагмент розміром 475 пар основ (рис. 2.2.1).

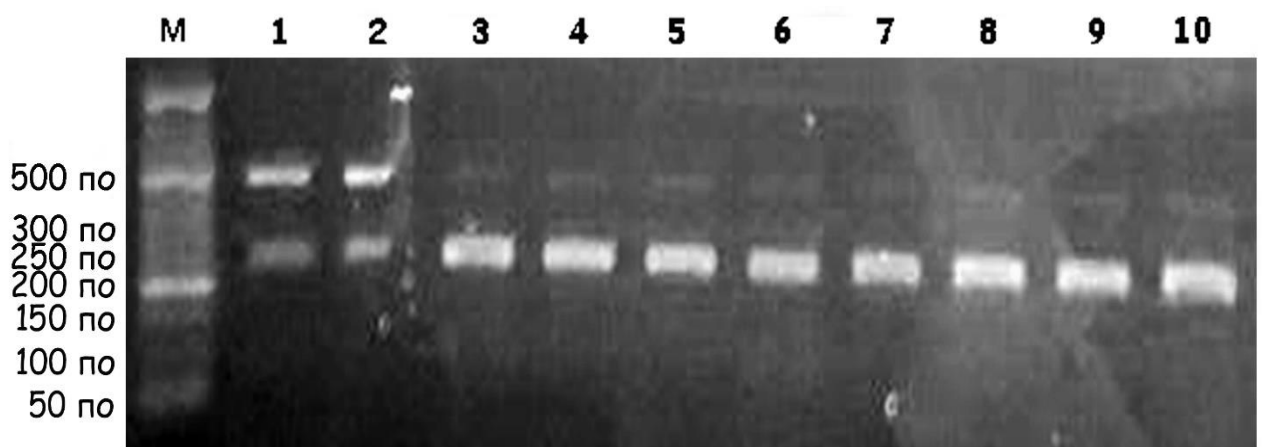


Рисунок 2.2.1 – Результати рестрикційного аналізу rs997509-поліморфізму гена *ENPP1*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 3–10 відповідають С/С-генотипу; доріжки 1, 2 – С/Т-генотипу.

#### *Рестрикційний аналіз поліморфізму rs1044498 гена ENPP1.*

Продукт ампліфікації (6 мкл) інкубували за температури 37 °С упродовж 18 годин із 5 ОД рестриктази *Eco47I* (*AvaII*) («Thermo Scientific», США) у буфері R такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду калію та 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 43213-й позиції гена *ENPP1* містився цитозин, ампліфікат, що складався з 238 пар основ, розщеплювався рестриктазою *Eco47I* на два фрагменти – 148 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін сайт рестрикції для *Eco47I* втрачався та утворювався один фрагмент розміром 238 пар основ (рис. 2.2.2).

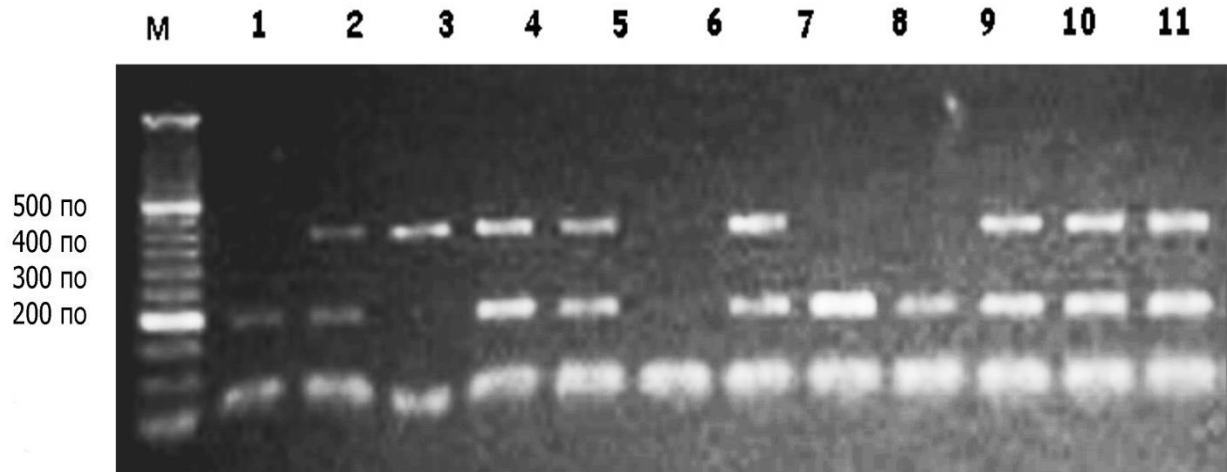


Рисунок 2.2.2 – Результати рестрикційного аналізу rs1044498-поліморфізму гена *ENPP1*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 1, 8, 9 відповідають К/К-генотипу; доріжки 2, 4, 5, 7, 10, 11 – К/Q-генотипу; доріжка 3 – Q/Q-генотипу; доріжка 6 – проба без ДНК пацієнта.

Ампліфікати вивчених фрагментів 1-го інтрона та 4-го екзона гена *ENPP1* розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили впродовж 30 хвилин. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

### 2.3. Методи статистичного аналізу

Статистичне опрацювання основної частини роботи реалізоване з використанням програми SPSS-17.0 (США). Безперервні дані наведені у вигляді середньої величини  $\pm$ SD (стандартне відхилення), номінальні дані подані у вигляді кількісних та відсоткових значень. Перевірку безперервних даних на нормальність розподілів здійснювали за допомогою тесту Шапіро – Вілка. Визначення достовірності відмінностей середніх значень між двома вибірками проводили за допомогою t-критерію Стьюдента.

За допомогою Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) перевіряли відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді – Вайнберга. Використовували



$\chi^2$ -критерій Пірсона для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах. Достовірність відмінностей середніх величин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшою поправкою Бонферроні.

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. Також була використана мультіваріабельна логістична регресія, що дозволила дослідити асоціацію генотипів із розвитком цукрового діабету 2-го типу в умовах поправки на такі фактори ризику, як стать, вік, ІМТ, наявність ожиріння, артеріальної гіпертензії (АГ) та звички палити.

Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення (linkage disequilibrium (LD)) використовували програму Arlequin (версія 3.1). Моделювання міжлокусних взаємодій для вивчення поєднаного впливу генетичного поліморфізму *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу здійснювали за допомогою методу скорочення багатфакторної розмірності (MDR).

Усі тести були двосторонніми, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Аналіз однонуклеотидних поліморфізмів генів – один із сучасних методів діагностики, що дозволяє виявити спадкову схильність до мультифакторіальних хвороб, зокрема й до цукрового діабету 2-го типу. Генетичні дефекти, що є основою розвитку резистентності тканин до дії інсуліну, порушують передавання внутрішньоклітинних сигналів від РІ до ефекторних структур клітини. Ураховуючи роль *ENPP1* у розвитку інсулінорезистентності, за рахунок впливу на тирозинкіназну активність  $\alpha$ -субодиниці рецептора інсуліну поліморфізми його гена можуть відігравати роль генетичних маркерів для ранньої діагностики цукрового діабету 2-го типу.

#### **3.1. Зв'язок алельних поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* з розвитком цукрового діабету 2-го типу**

Серед однонуклеотидних поліморфізмів гена *ENPP1* rs1044498 (K121Q) є одним із найбільш вивчених. Доведена його роль у розвитку інсулінорезистентності та пов'язаних із нею захворювань, таких як ЦД 2-го типу, ожиріння, метаболічний синдром, у різних популяціях світу. Суть алельного поліморфізму rs1044498 полягає в тому, що в 48213-й позиції 4-го екзона гена *ENPP1* відбувається заміна аденіну на цитозин, що призводить до заміщення 121-ї амінокислоти лізину на глютамін у соматомедин-В-подібному домені білка.

Інший поліморфний сайт цього гена rs997509 є маловивченим, але існують докази про його вплив на розвиток ЦД 2-го типу, метаболічного синдрому та порушення толерантності до глюкози за наявності супутнього ожиріння. Він являє собою заміну цитозину на тимін у 43822-й позиції 1-го інтрона гена *ENPP1* [145].

Частоту можливих поліморфних варіантів генотипу та алелів за rs997509- та rs1044498 -поліморфізмами гена *ENPP1*, а також перевірку відповідності розподілу основного й мінорного алелів рівновазі Харді – Вайнберга наведено в таблиці 3.1.1.

Таблиця 3.1.1 – Частота алелів та генотипів за поліморфізмами rs997509 і rs1044498 гена *ENPP1* у групах порівняння

	Контрольна група	Хворі з ЦД 2-го типу
<b>rs997509</b>		
Гомозиготи С/С, n (%)	285 (94,4)	282 (89,0)
Гетерозиготи С/Т, n (%)	17 (5,6)	35 (11,0)
Гомозиготи Т/Т, n (%)	0 (0)	0 (0)
С-алель	0,97	0,94
Т-алель	0,03	0,06
$\chi^2$	0,25	1,08
P	> 0,05	> 0,05
<b>rs1044498</b>		
Гомозиготи К/К, n (%)	205 (67,9)	188 (59,3)
Гетерозиготи К/Q, n (%)	86 (28,5)	108 (34,1)
Гомозиготи Q/Q, n (%)	11 (3,6)	21 (6,6)
К-алель	0,82	0,76
Q-алель	0,18	0,24
$\chi^2$	0,28	1,02
P	> 0,05	> 0,05

Примітка: n – кількість пацієнтів;  $\chi^2$  і P відображають відхилення в кожній групі від рівноваги Харді – Вайнберга

Із наведених даних випливає, що частоти наведених генотипів в обох групах не мають статистично достовірних відмінностей від очікуваних за генетично-популяційним законом величин ( $P > 0,05$ ).

Ураховуючи, що серед осіб обох груп порівняння не виявлено жодного пацієнта з генотипом Т/Т, 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).

На рисунку 3.1.1 наведені результати аналізу частот окремих генотипів за досліджуваними алельними поліморфізмами гена *ENPP1* серед пацієнтів контрольної групи та хворих із цукровим діабетом 2-го типу.

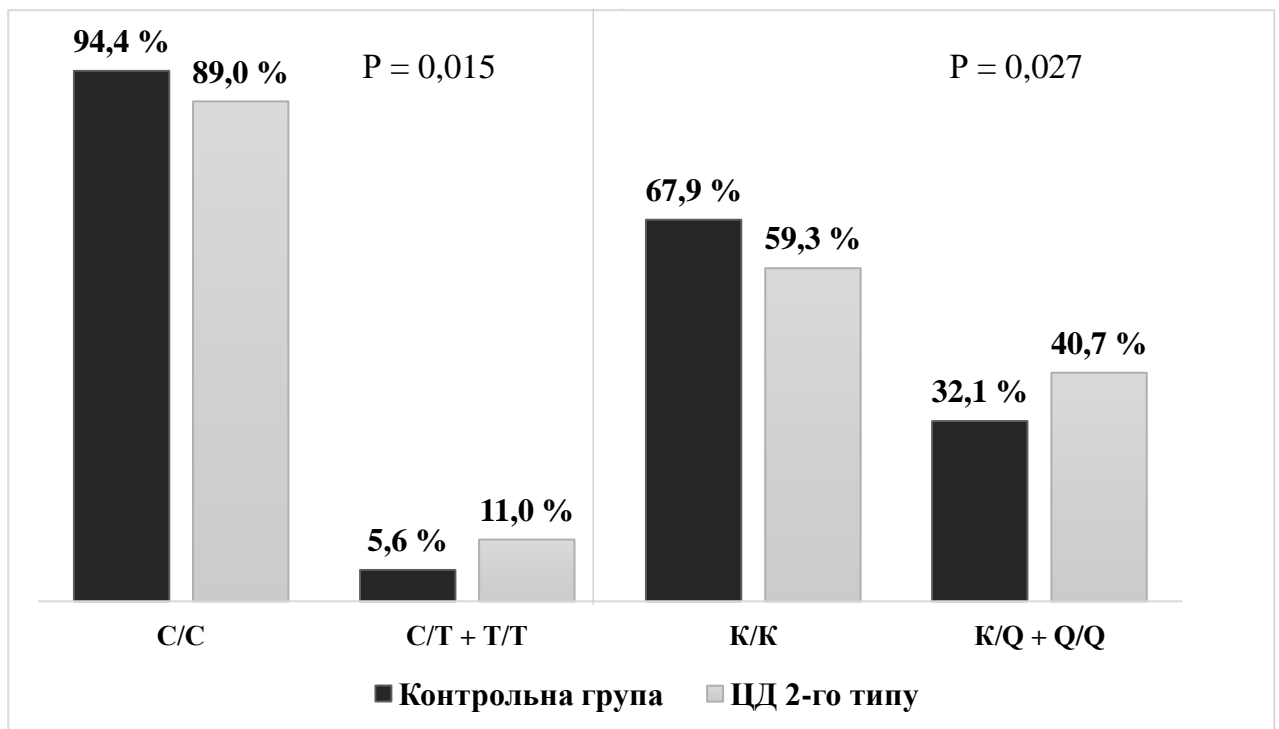


Рисунок 3.1.1 – Частота генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у хворих із цукровим діабетом 2-го типу (сірі стовпчики) та серед пацієнтів контрольної групи (чорні стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона.

Аналізуючи одержані результати за генетичним поліморфізмом rs997509 виявлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем (C/C) та носіїв мінорного T-алеля (C/T + T/T) 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 % ( $\chi^2 = 5,887$ ;  $P = 0,015$ ) [141]. Вивчаючи розподіл генотипів за rs1044498-поліморфізмом виявлені подібні результати. Серед пацієнтів із цукровим діабетом та осіб контрольної групи співвідношення генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) дорівнювало 59,3 та 40,7 % порівняно з 67,9 та 32,1 % ( $\chi^2 = 4,906$ ;  $P = 0,027$ ) відповідно [142]. Отже, статистично значущими є відмінності розподілу генотипів за досліджуваними поліморфними локусами між групами порівняння, що підтверджує асоціацію rs997509- та rs1044498-поліморфних варіантів гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу.

Результати регресійного аналізу асоціації генотипів за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в рамках різних моделей успадкування наведені в таблиці 3.1.2.

Методом бінарної логістичної регресії встановлений достовірний зв'язок в рамках СТ vs CC-моделі успадкування за rs997509-поліморфізмом ( $P_n = 0,017$ ) та домінантної моделі успадкування (KQ/QQ vs K/K) за rs1044498-поліморфним варіантом гена *ENPP1* ( $P_n = 0,027$ ). Розрахунок відносного ризику в рамках наведених моделей показав, що в носіїв мінорного T-алеля ЦД 2-го типу зустрічався вдвічі частіше (95 % CI = 1,139–3,800), рази частіше ніж у гомозигот за основним C-алелем за rs997509-поліморфним локусом досліджуваного гена. Ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу був у 1,4 (95 % CI = 1,043–2,016) рази 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. Так, у рамках KQ/QQ vs K/K

моделі успадкування показник  $P_{\text{попр}}$  становив 0,026 ( $OR_{\text{попр}} = 1,455$ ; 95 % CI = 1,046–2,024). Результати аналізу в рамках інших моделей успадкування не були статистично значущими.

**Таблиця 3.1.2 – Аналіз зв'язку rs997509 та rs1044498 поліморфізмів гена ENPP1 з ЦД 2-го типу з урахуванням різних моделей успадкування**

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)
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)

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

Відомо, що при цукровому діабеті 2-го типу порушуються всі види обміну речовин, але насамперед – метаболізм вуглеводів та ліпідів, які впливають на основні його клінічні прояви. Хронічна гіперглікемія та дисліпідемія в разі тривалого ЦД призводить до ураження, дисфункції або недостатності різних органів та систем, що є причиною діабетичних ускладнень. Проте ступінь їх прогресування значно відрізняється в різних пацієнтів. Механізми, за допомогою яких гіперглікемія негативно впливає на  $\beta$ -клітини, є складними та багатофакторними. Є дані, що ці механізми передбачають збільшення виробництва активних форм кисню в  $\beta$ -клітинах, індукованих оксидативним стресом, що змінює транскрипцію генів та експресію білків, а також сприяє збільшенню апоптозу  $\beta$ -клітин, водночас

порушується як дія інсуліну, так і його секреція. У таблиці 3.1.3 наведені відомості про основні показники концентрації глюкози натще в плазмі крові хворих із ЦД 2-го типу та контрольній групі з різними генотипами за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, яка обов'язково контролюється в процесі лікування недуги. Установлено, що значущий вплив досліджуваних генетичних поліморфізмів *ENPP1* на вміст глюкози в крові натще був відсутнім як серед осіб контрольної групи, так і серед хворих із ЦД 2-го типу ( $P = 0,314$ ;  $P = 0,132$  та  $P = 0,119$ ;  $P = 0,698$  відповідно). Дослідження зв'язку цього показника під час порівняння його в групах за однаковим генотипом показало відсутність істотної залежності як за поліморфним варіантом rs997509 ( $P = 0,197$ ;  $P = 0,211$ ), так і за rs1044498 ( $P = 0,231$ ;  $P = 0,152$ ) гена *ENPP1*.

Таблиця 3.1.3 – Показники глюкози крові натще в дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за rs997509- та rs1044498- поліморфізмами гена *ENPP1*, ( $M \pm m$ )

rs997509	C/C	C/T + T/T	F	$P_1$
Контроль	5,24 ± 0,75	5,43 ± 0,69	1,017	0,314
ЦД 2-го типу	9,31 ± 3,06	10,18 ± 3,68	2,445	0,119
$P_2$	0,197	0,211		
rs1044498	K/K	K/Q + Q/Q	F	$P_1$
Контроль	5,29 ± 0,74	5,16 ± 0,75	2,285	0,132
ЦД 2-го типу	9,35 ± 3,29	9,48 ± 2,91	0,151	0,698
$P_2$	0,231	0,152		

Примітка: F – критерій Фішера;  $P_1$  і  $P_2$  – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу ( $P_1$ ) і між контролем та ЦД 2-го типу за  $t$ -критерієм Стьюдента ( $P_2$ ).

Проте під час аналізу показників глікозильованого гемоглобіну серед пацієнтів із ЦД 2-го типу з різними варіантами генотипів за rs997509-поліморфізмом була виявлена достовірна відмінність ( $F = 3,969$ ;  $P = 0,047$ ), що не можна говорити про поліморфізм 4-го екзона гена *ENPP1* ( $F = 1,267$ ;  $P = 0,261$ ) (табл. 3.1.4). Отже, T-алель rs997509-поліморфного локуса може бути асоційований із підвищеним рівнем глікозильованого гемоглобіну у пацієнтів із ЦД 2-го типу.

Таблиця 3.1.4 – Показники глікозильованого гемоглобіну в плазмі крові хворих із ЦД 2-го типу залежно від варіантів генотипу за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1*, ( $M \pm m$ )

<b>rs997509</b>	C/C (n = 282)	C/T + T/T (n = 35)	F	P
HbA1c, %	8,39 ± 2,23	9,19 ± 2,39	3,969	0,047
<b>rs1044498</b>	K/K (n = 188)	KQ+QQ (n = 129)	F	P
HbA1c, %	8,37 ± 2,29	8,66 ± 2,21	1,267	0,261

Примітка: n – кількість пацієнтів; HbA1c – глікозильований гемоглобін

Низка досліджень *in vitro* та на експериментальних тваринах показали, що тривала гіперліпідемія також погіршує функцію  $\beta$ -клітин, що ускладнює процес лікування цукрового діабету. Доведено, що жирні кислоти інгібують секрецію інсуліну, стимульовану глюкозою, погіршують експресію гена інсуліну та, що більш важливо, сприяють апоптозу  $\beta$ -клітин. Під час вивчення впливу різних алельних варіантів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* на показники ліпідного обміну, а саме: загального холестеролу, ліпопротеїнів низької, дуже низької та високої густини, тригліцеридів, статистично значущих відмінностей виявлено не було (табл. 3.1.5) [147].



Таблиця 3.1.5 – Показники ліпідного обміну у хворих із ЦД 2-го типу залежно від варіантів генотипу за rs997509 та rs1044498 поліморфізмами гена *ENPP1*, (M ± m)

rs997509	C/C (n=282)	C/T + T/T (n=35)	F	P
Загальний ХС, ммоль/л	5,19 ± 1,41	5,54 ± 1,06	1,888	0,170
ХС ЛПНГ, ммоль/л	3,35 ± 1,34	3,39 ± 1,18	0,042	0,838
ХС ЛПДНГ, ммоль/л	0,75 ± 0,35	0,76 ± 0,36	0,004	0,947
ХС ЛПВГ, ммоль/л	0,98 ± 0,29	1,02 ± 0,29	0,563	0,454
Тригліцериди, ммоль/л	1,82 ± 1,22	1,9 ± 1,12	0,131	0,718
rs1044498	K/K (n=188)	KQ+QQ (n=129)	F	P
Загальний ХС, ммоль/л	5,18 ± 1,43	5,31 ± 1,29	0,664	0,416
ХС ЛПНГ, ммоль/л	3,38 ± 1,36	3,32 ± 1,28	0,206	0,651
ХС -ЛПДНГ, ммоль/л	0,76 ± 0,36	0,73 ± 0,34	0,639	0,424
ХС ЛПВГ, ммоль/л	0,98 ± 0,29	0,98 ± 0,29	0,015	0,901
Тригліцериди, ммоль/л	1,86 ± 1,41	1,78 ± 0,83	0,296	0,587

Примітка: n – кількість пацієнтів; ХС – холестерол; ЛПНГ – ліпопротеїни низької густини; ЛПДНГ – ліпопротеїни дуже низької густини; ЛПВГ – ліпопротеїни високої густини

Установлено, що 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*. Виявлена асоціація між поліморфним сайтом rs997509 першого інтрона гена *ENPP1* та розвитком цукрового діабету 2-го типу в українській популяції. У носіїв мінорного Т-алеля ЦД 2-го типу зустрічається вдвічі частіше, ніж у гомозигот за основним С-алелем (OR<sub>попр</sub> = 2,086; P<sub>попр</sub> = 0,027). Досліджено, що однонуклеотидний поліморфізм четвертого екзона

rs1044498-гена *ENPP1* асоційований із 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 ( $OR_{\text{попр}} = 1,455$ ;  $P_{\text{попр}} = 0,026$ ).

### 3.2. Асоціація rs997509- та rs1044498-поліморфних варіантів гена *ENPP1* із різними факторами ризику цукрового діабету 2-го типу

Відомо, що з розвитком цукрового діабету 2-го типу пов'язані дві групи факторів ризику. До першої належать ті, що не модифікуються, – це спадкова схильність, вік, стать, етнічна належність, до другої – ті, на які можна вплинути в процесі життя, тобто модифіковані: підвищений індекс маси тіла, ожиріння, паління, супутня артеріальна гіпертензія тощо.

*Аналіз за віком.* Вік – є одним із факторів ризику ЦД 2-го типу. Чим особа старша, тим більша загроза виникнення в неї діабету. Ймовірність появи захворювання зростає в осіб після 45 років. Статистично значущого впливу досліджуваних генетичних маркерів на такий показник, як вік пацієнтів, виявлено не було як серед осіб контрольної групи, так і серед хворих із ЦД 2-го типу ( $P = 0,762$ ;  $P = 0,667$  та  $P = 0,191$ ;  $P = 0,549$  відповідно) (табл. 3.2.1). Дослідження зв'язку віку в групах порівняння за однаковим генотипом також продемонструвало відсутність істотної залежності як за поліморфним варіантом rs997509 ( $P = 0,999$ ;  $P = 0,901$ ), так і за rs1044498 ( $P = 0,979$ ;  $P = 0,933$ ) гена *ENPP1*.

Таблиця 3.2.1 – Вік пацієнтів у дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за rs997509 та rs1044498 поліморфізмами гена *ENPP1*, ( $M \pm m$ )

<b>rs997509</b>	C/C	C/T + T/T	F	P <sub>1</sub>
Контроль	65,02 ± 14,68 (282)	66,12 ± 10,76 (17)	0,092	0,762
ЦД 2-го типу	65,03 ± 8,14 (285)	64,40 ± 8,50 (35)	0,186	0,667
P <sub>2</sub>	0,999	0,901		
<b>rs1044498</b>	K/K	K/Q + Q/Q	F	P <sub>1</sub>
Контроль	64,3 ± 14,3 (205)	66,7 ± 14,8 (188)	1,721	0,191
ЦД 2-го типу	64,73 ± 8,35 (97)	65,29 ± 7,93 (129)	0,359	0,549
P <sub>2</sub>	0,979	0,933		

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

У результаті проведеної роботи ми вивчили розподіл генотипів за досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу різних за віком виявлення захворювання, що подано в таблиці 3.2.2. Усіх хворих було поділено 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

**Таблиця 3.2.2 – 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 (%)	контроль (%)	ЦД (%)	контроль (%)	ЦД (%)
<b>rs997509</b>						
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)
$\chi^2$	4,492		0,247		4,731	
P	0,034		0,619		0,030	
<b>rs1044498</b>						
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)
$\chi^2$	1,254		1,826		0,528	
P	0,263		0,177		0,467	

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

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 у III групі – 97,2 і 2,8 % порівняно з 88,4 і 11,6 % відповідно. Статистично значуща відмінність одержаних результатів спостерігалась у I ( $\chi^2 = 4,492$ ; P = 0,034) та III ( $\chi^2 = 4,731$ ; P = 0,030) вікових

групах хворих. Під час вивчення одержаних результатів розподілу за rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* отримали, що співвідношення генотипів К/К та К/Q + Q/Q у I групі серед пацієнтів контрольної групи становило 72,2 і 27,8 %, а серед піцієнтів із ЦД 2-го типу – 65,4 і 34,6 %, у II групі – 65,2 і 34,8 % порівняно з 55,7 і 44,3 %, у III – 64,5 і 35,5 % порівняно з 58,1 і 41,9 % відповідно. Отже, 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) [142].

У таблиці 3.2.3 наведені результати регресійного аналізу зв'язку між генетичними маркерами цукрового діабету 2-го типу rs997509 та rs1044498 і таким фактором ризику, як вік.

**Таблиця 3.2.3 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* з ЦД 2-го типу в осіб різних вікових груп з урахуванням різних моделей успадкування**

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (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					

Продовження таблиці 3.2.3

1	2	3	4	5	6
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: SNP – однонуклеотидний поліморфізм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал;  $P_{\text{спост}}$  – спостережуване значення P (без поправки на коваріати);  $OR_{\text{спост}}$  – спостережуване відношення шансів;  $P_{\text{попр}}$  – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ, ожиріння та АГ у загальній групі;  $OR_{\text{попр}}$  – відношення шансів після поправки на коваріати

Статистично достовірна асоціація без урахування факторів ризику діабету була виявлена серед пацієнтів I та III вікових груп у рамках CT vs CC-генетичної моделі успадкування ( $P_{\text{спост}} = 0,042$  та  $P_{\text{спост}} = 0,044$ ). З'ясувалося, що серед осіб старше 75 років, носіїв мінорного T-алеля за rs997509-поліморфізмом, ризик виникнення діабету в 4,5 рази ( $OR_{\text{спост}} = 4,561$ ; CI = 1,040–20,014) вищий порівняно з гомозиготами за основним C-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.* Відомо, що в розвитку цукрового діабету 2-го типу відзначаються певні гендерні особливості. Згідно з результатами епідеміологічних досліджень частота ЦД 2-го типу вища в чоловіків, однак поширеність його вище серед жінок, ймовірно, у зв'язку з більшою середньою тривалістю життя.

Розподіл частот алельних варіантів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* в осіб жіночої та чоловічої статей у групах порівняння подано в таблиці 3.2.4 [146].

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 – у 13 % (у групі порівняння це співвідношення становило 95,3 та 4,7 % відповідно) ( $\chi^2 = 5,072$ ;  $P = 0,024$ ). Співвідношення генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) за rs1044498-поліморфізмом в осіб жіночої статі в досліджуваній групі становило 56,2 і 43,8 %, а в контрольній групі – 69,2 і 30,8 % відповідно ( $\chi^2 = 4,582$ ;  $P = 0,032$ ).

**Таблиця 3.2.4 – Розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498- поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу та в контрольній групі в осіб різної статі**

Генотип	Жінки		Чоловіки	
	ЦД	контроль	ЦД	контроль
rs997509				
C/C (%)	141 (87,0)	102 (95,3)	141 (91,0)	183 (93,8)
C/T + T/T (%)	21 (13,0)	5 (4,7)	14 (9,0)	12 (6,2)
$\chi^2$	5,072		1,040	
P	0,024		0,308	
rs1044498				
K/K	91 (56,2)	74 (69,2)	97 (62,6)	131 (67,2)
K/Q + Q/Q	71 (43,8)	33 (30,8)	58 (37,4)	64 (32,8)
$\chi^2$	4,582		0,804	
P	0,032		0,370	

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

На рисунку 3.2.1 наведені результати порівняння частот генотипів за досліджуваними поліморфними сайтами між жінками обох груп.

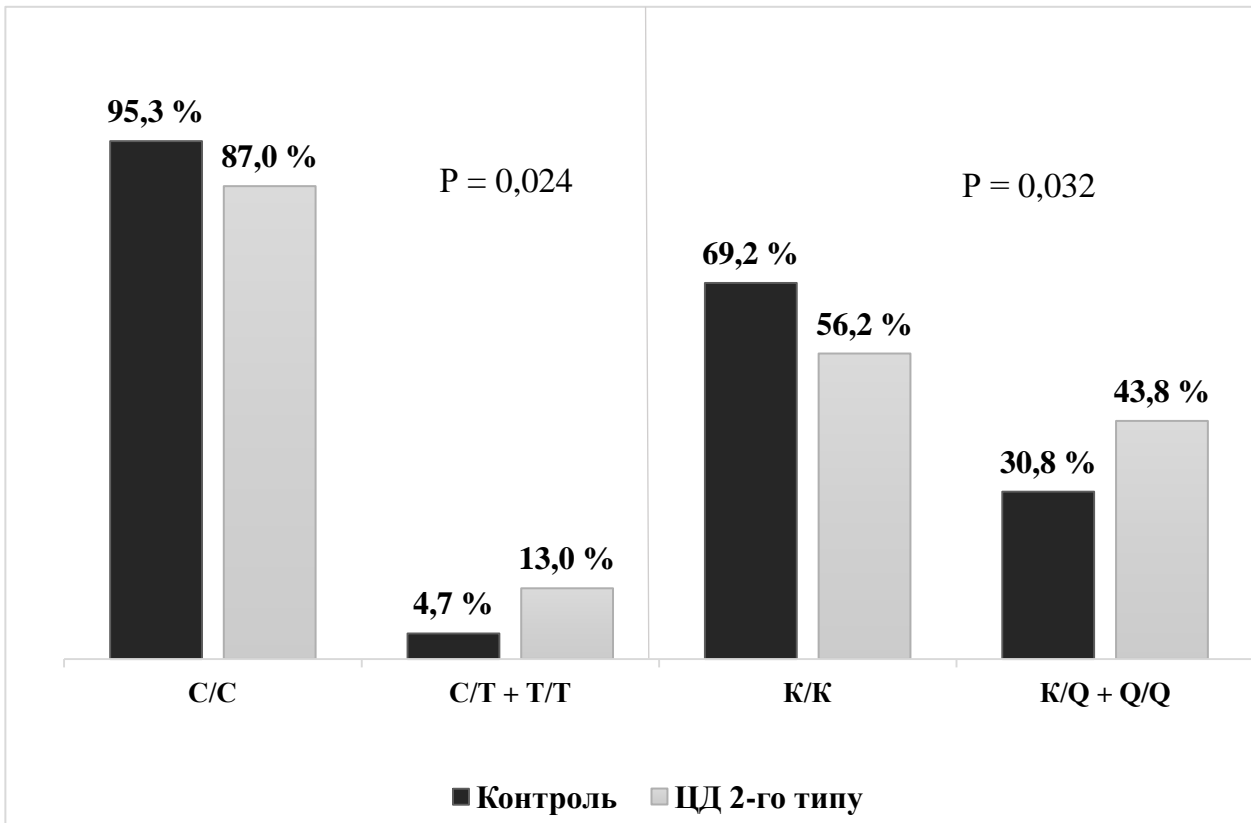


Рисунок 3.2.1 – Частота генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у жінок з ЦД 2-го типу (сірі стовпчики) та в контрольній групі (чорні стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за  $\chi^2$ - критерієм Пірсона

Показано, що існує достовірна відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфними варіантами гена *ENPP1* серед пацієнток із цукровим діабетом та осіб контрольної групи.

У таблиці 3.2.5 подані 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.

Таблиця 3.2.5 – Аналіз зв'язку rs997509 та rs1044498 поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб жіночої статі з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	P <sub>спост</sub>	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	P <sub>попр</sub>	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	CT vs CC	0,031	3,038 (1,109–8,326)	0,040	3,130 (1,053–9,306)



## Продовження таблиці 3.2.5

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)

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

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 (рис. 3.2.2).

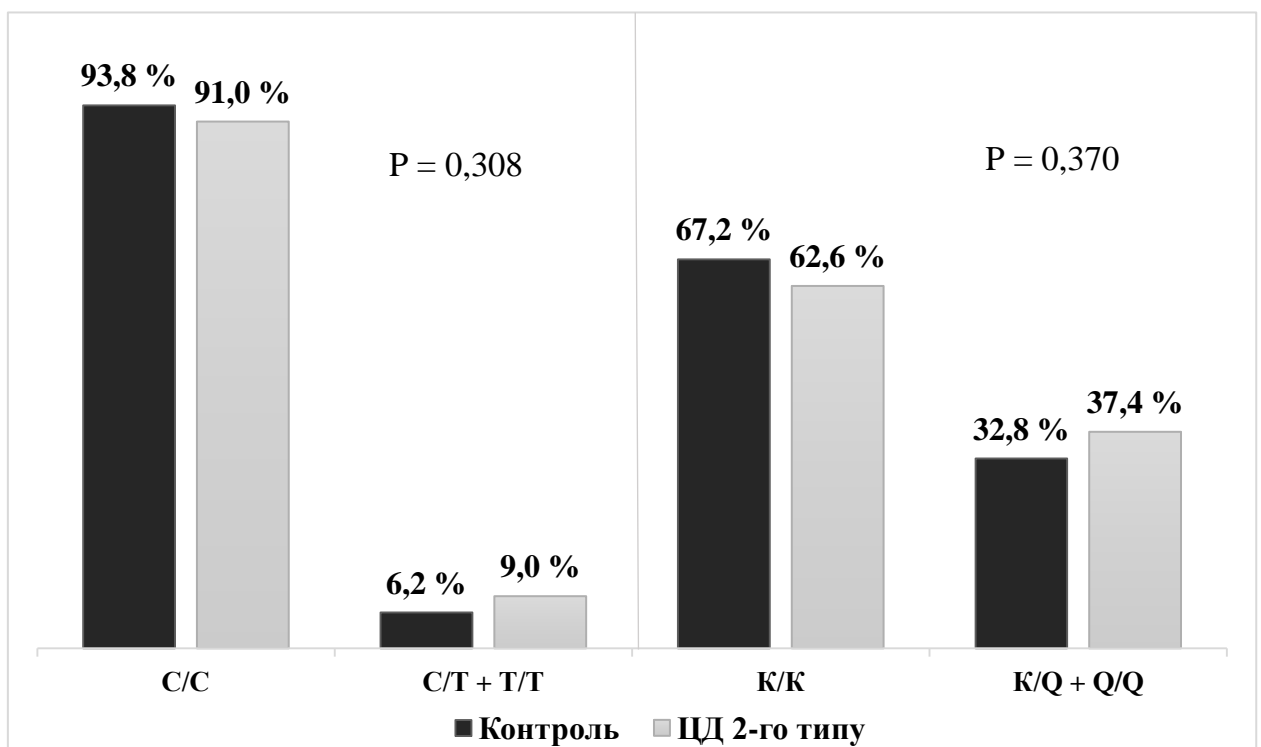


Рисунок 3.2.2 – Частота генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у чоловіків із ЦД 2-го типу (сірі стовпчики) та в контрольній групі (чорні стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона

Виявлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем (C/C) та носіїв мінорного алеля (C/T + T/T) поліморфного варіанта 1-го інтрона в групі дослідження становило 91 та 9 % (у контролі – 93,8 та 6,2 % відповідно) ( $\chi^2 = 1,040$ ;  $P = 0,308$ ). Частота генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) за K121Q поліморфізмом серед хворих на ЦД 2-го типу дорівнювала – 62,6 і 37,4 %, а в контрольній групі – 67,2 і 32,8 %, відповідно ( $\chi^2 = 0,804$ ;  $P = 0,370$ ).

Дослідження генотипної асоціації поліморфних локусів першого інтрона та четвертого екзона гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі за допомогою мультиваріабельної логістичної регресії в жодній із поданих 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 ( $P > 0,05$ ) (табл. 3.2.6).

**Таблиця 3.2.6 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498- поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі з урахуванням різних моделей успадкування**

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	CT vs CC	0,310	1,514 (0,679–3,376)	0,293	1,574 (0,676–3,665)
rs1044498	KQ vs K/K	0,446	1,193 (0,758–1,876)	0,457	1,198 (0,744–1,927)
	KQ/QQ vs K/K	0,370	1,224 (0,787–1,904)	0,418	1,212 (0,761–1,932)
	QQ vs K/K	0,686	1,268 (0,401–4,013)	0,830	1,142 (0,339–3,850)

Примітка. Див. таблицю 3.2.2

*Аналіз за ІМТ та наявністю ожиріння.* У дослідженні було вивчено зв'язок індексу маси тіла (ІМТ), який розрахований на основі показників зросту та маси тіла, в осіб обох груп порівняння залежно від різних варіантів

генотипів, утворених за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* (табл. 3.2.7) [144].

**Таблиця 3.2.7 – Антропометричні показники в дослідній та контрольній групах залежно від генотипу за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1*, (M ± m)**

<b>rs997509</b>		C/C	C/T + T/T	F	P <sub>1</sub>
Зріст, см	Контроль	164,24 ± 9,94	161,29 ± 11,24	1,391	0,239
	ЦД	168,88 ± 8,31	166,46 ± 7,49	2,694	0,102
	P <sub>2</sub>	0,720	0,704		
Маса тіла, кг	Контроль	73,91 ± 13,91	75,53 ± 15,05	0,217	0,642
	ЦД	83,29 ± 15,34	86,46 ± 13,50	1,356	0,245
	P <sub>2</sub>	0,651	0,591		
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	Контроль	27,45 ± 4,87	28,99 ± 4,91	1,603	0,206
	ЦД	29,18 ± 4,74	31,18 ± 4,26	5,688	0,018
	P <sub>2</sub>	0,799	0,737		
<b>rs1044498</b>		K/K	K/Q + Q/Q	F	P <sub>1</sub>
Зріст, см	Контроль	164,04 ± 10,11	164,14 ± 9,86	0,007	0,635
	ЦД	168,96 ± 8,45	168,10 ± 7,94	0,826	0,364
	P <sub>2</sub>	0,709	0,755		
Маса тіла, кг	Контроль	72,88 ± 13,69	76,35 ± 14,29	4,106	0,044
	ЦД	83,02 ± 15,46	84,55 ± 14,74	0,777	0,379
	P <sub>2</sub>	0,624	0,690		
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	Контроль	27,11 ± 4,73	28,41 ± 5,10	4,727	0,030
	ЦД	29,07 ± 4,89	29,88 ± 4,43	2,270	0,133
	P <sub>2</sub>	0,773	0,828		

Примітка: F – критерій Фішера; P<sub>1</sub> і P<sub>2</sub> – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу (P<sub>1</sub>) і між контролем та ЦД 2-го типу за *t*-критерієм Стьюдента (P<sub>2</sub>)

Результати аналізу продемонстрували, що серед пацієнтів із ЦД 2-го типу виявлено вплив поліморфізму 1-го інтрона гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 на показники індексу маси тіла (P = 0,018). Так, у гомозигот за основним С-алелем середнє значення ІМТ було

29,18 ± 4,74, а серед носіїв мінорного Т-алеля цей показник достовірно відрізнявся і становив 31,18 ± 4,26 (F = 5,688). Проте на такі показники, як зріст та маса тіла, статистично значущого впливу виявлено не було (P = 0,102; P = 0,245 відповідно). За допомогою розрахунку критерію Фішера в контрольній групі не виявлено впливу rs997509-поліморфізму під час аналізу за зростом (F = 1,391; P = 0,239), масою тіла (F = 0,217; P = 0,642) та ІМТ (F = 1,603; P = 0,206). Поряд із цим, порівнюючи вищенаведені параметри між представниками обох груп з однаковим генотипом, достовірної різниці не було виявлено (P > 0,05).

Вивчаючи вплив алельного поліморфізму 4-го екзона гена *ENPP1* на такі показники, як зріст, масу тіла та ІМТ, серед пацієнтів дослідної групи статистично значущих відмінностей виявлено не було (P = 0,364; P = 0,379 та P = 0,133 відповідно). Проте в контрольній групі показники маси тіла та ІМТ достовірно відрізнялися між собою (P = 0,044 та P = 0,030 відповідно). Дослідження зв'язку цих параметрів під час порівняння їх у групах за однаковим генотипом продемонструвало відсутність істотної залежності за rs1044498-поліморфізмом досліджуваного гена (P > 0,05).

Після цього нам стало цікаво провести аналіз впливу генетичних поліморфізмів rs997509 та rs1044498 на розвиток ЦД 2-го типу в осіб із нормальною та надмірною вагою тіла, розподіливши осіб обох груп на дві підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ (< 25 кг/м<sup>2</sup> і ≥ 25 кг/м<sup>2</sup>) (табл. 3.2.8). Показано, що значуща відмінність щодо розподілу різних генотипів за поліморфним сайтом rs997509 між хворими з ЦД 2-го типу та представниками контролю в осіб із ІМТ < 25 кг/м<sup>2</sup> була відсутньою ( $\chi^2 = 0,119$ ; P = 0,731). Натомість у групі з ІМТ ≥ 25 кг/м<sup>2</sup> частота алельних варіантів за досліджуваним SNP між групами порівняння достовірно відрізнялася ( $\chi^2 = 4,776$ ; P = 0,029). Так, пацієнтів із ЦД 2-го типу з генотипом С/С було 87,8 %, а з генотипом С/Т + Т/Т – 12,2 %. Це співвідношення серед осіб контрольної групи становило 93,8 і 6,2 % відповідно. Під час проведення

аналізу частоти rs1044498-поліморфного варіанта гена *ENPP1* в осіб, які мають різне значення ІМТ окремо в контрольній групі й у групі хворих із ЦД 2-го типу, було встановлено відсутність статистично достовірної різниці розподілу генотипів як в осіб з ІМТ < 25 кг/м<sup>2</sup> ( $\chi^2 = 0,407$ ; P = 0,687), так і в осіб з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> ( $\chi^2 = 2,951$ ; P = 0,086).

Таблиця 3.2.8 – Розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу та в контрольній групі залежно від показників ІМТ

Генотип	ІМТ < 25 кг/м <sup>2</sup>		ІМТ $\geq 25$ кг/м <sup>2</sup>	
	ЦД (%)	контроль (%)	ЦД (%)	контроль(%)
rs997509				
C/C	51 (94,4)	89 (95,7)	231 (87,8)	196 (93,8)
C/T + T/T	3 (5,6)	4 (4,3)	32 (12,2)	13 (6,2)
$\chi^2$	0,119		4,776	
P	0,731		0,029	
rs1044498				
K/K	36 (66,7)	68 (73,1)	152 (57,8)	137 (65,6)
K/Q + Q/Q	18 (33,3)	25 (29,9)	111 (42,2)	72 (34,4)
$\chi^2$	0,687		2,951	
P	0,407		0,086	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Аналіз за допомогою логістичної регресії в рамках різних моделей успадкування не виявив статистично значущого зв'язку поліморфних локусів 1-го інтрона (rs997509) та 4-го екзона (rs1044498) гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 із розвитком цукрового діабету 2-го типу в осіб з нормальним ІМТ як до, так і після поправки на стать, вік, артеріальну гіпертензію та звичку палити (табл. 3.2.9).

Таблиця 3.2.9 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфних варіантів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб із нормальним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	P <sub>спост</sub>	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	P <sub>попр</sub>	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	CT vs CC	0,731	1,309 (0,282–6,081)	0,632	1,467 (0,306–7,037)

Продовження таблиці 3.2.9

rs1044498	KQ vs K/K	0,236	1,575 (0,742– 3,343)	0,336	1,456 (0,677– 3,130)
	KQ/QQ vs K/K	0,408	1,360 (0,657– 2,817)	0,582	1,233 (0,585– 2,597)
	QQ vs K/K	0,443	0,420 (0,046– 3,856)	0,363	0,351 (0,037– 3,359)

Примітка. Див. таблицю 3.1.2

Метод бінарної логістичної регресії дав можливість виявити вплив генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфними варіантами гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в осіб із підвищеним ІМТ (табл. 3.2.10). Установлено достовірний зв'язок між rs997509-поліморфізмом та ЦД 2-го типу в осіб з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> ( $P = 0,032$ ) у рамках СТ vs СС-генетичної моделі успадкування. Цей зв'язок зберігався після поправки на такі фактори ризику ЦД 2-го типу, як вік, стать, ожиріння, наявність артеріальної гіпертензії і звичку палити. Виявлено, що в осіб із підвищеним ІМТ носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу достовірно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем ( $OR_{\text{попр}} = 2,223$ ;  $CI = 1,076\text{--}4,594$ ;  $P_{\text{попр}} = 0,031$ ).

**Таблиця 3.2.10 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфних варіантів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб із підвищеним ІМТ з урахуванням різних моделей успадкування**

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)
rs997509	СТ vs СС	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)

Примітка. Див. таблицю 3.1.2

Виявилось, що в осіб із Q/Q-генотипом ризик розвитку ЦД 2-го типу зростає у 1,8 раза (CI = 1,063–3,653). Результати аналізу в межах інших моделей не були значущими (P > 0,05).

Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфізмами гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 у дослідних та контрольних осіб у підгрупах, утворених за наявності ожиріння в анамнезі, наведений у таблиці 3.2.11. З'ясовано, що серед осіб, із супутнім ожирінням частота різних алельних варіантів за SNP rs997509 достовірно відрізняється між пацієнтами обох груп порівняння ( $\chi^2 = 5,098$ ; P = 0,024). Серед пацієнтів із ЦД 2-го типу співвідношення гомозигот за основним С-алелем до носіїв мінорного Т-алеля становило 81,0 і 19,0 %, а серед групи контролю – 92,4 і 7,6 % відповідно. Натомість відмінність щодо такого розподілу серед осіб без ожиріння була відсутня ( $\chi^2 = 0,140$ ; P = 0,709).

**Таблиця 3.2.11 – Розподіл генотипів за rs997509 та rs1044498 поліморфізмами гена ENPP1 у пацієнтів з ЦД 2-го типу та в контрольній групі залежно від наявності супутнього ожиріння**

Генотип	Ожиріння		Без ожиріння	
	ЦД (%)	контроль (%)	ЦД (%)	контроль (%)
rs997509				
C/C	102 (81,0)	73 (92,4)	180 (94,2)	212 (95,1)
C/T + T/T	24 (19,0)	6 (7,6)	11 (5,8)	11 (4,9)
$\chi^2$	5,098		0,140	
P	0,024		0,709	
rs1044498				
K/K	126 (66,0)	156 (70,0)	62 (49,2)	49 (62,0)
K/Q + Q/Q	65 (34,0)	67 (30,0)	64 (50,8)	30 (38,0)
$\chi^2$	0,753		3,214	
P	0,386		0,073	

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

Під час аналізу частоти можливих варіантів за SNP rs1044498 у підгрупі з ожирінням, хворих із ЦД 2-го типу гомозигот за основним К-алелем було 66,0 %, а носіїв мінорного алеля (K/Q + Q/Q) – 34,0 %. Серед

осіб контрольної групи це співвідношення становило 70,0 і 30,0 % відповідно, що не мало статистичної значущості ( $\chi^2 = 0,753$ ;  $P = 0,386$ ). У підгрупі без ожиріння достовірної відмінності також не було виявлено між пацієнтами з ЦД 2-го типу та контролем ( $\chi^2 = 3,214$ ;  $P = 0,073$ ).

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 ожирінням, дозволило встановити, що в рамках генетичної моделі успадкування СТ vs CC за SNP rs997509 в осіб із С/Т-генотипом ризик виникнення ЦД 2-го типу був у 2,8 раза ( $CI = 1,114-7,356$ ;  $P_{\text{спост}} = 0,029$ ) вищим, ніж у гомозигот за основним алелем (табл. 3.2.12). Після урахування статі, віку, ІМТ, звичку палити та артеріальної гіпертензії достовірність результату зберігалася ( $P_{\text{попр}} = 0,023$ ), а ризик збільшувався у 3,2 раза ( $CI = 1,175-8,881$ ). 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 ( $P > 0,05$ ).

Таблиця 3.2.12 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб з ожирінням з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	СТ 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)

Примітка. Див. таблицю 3.2.2



Після поправки на вивчені фактори ризику діабету показник  $P$  під час аналізу в рамках домінантної ( $P_{\text{попр}} = 0,074$ ), супердомінантної ( $P_{\text{попр}} = 0,366$ ) та рецесивної ( $P_{\text{попр}} = 0,129$ ) генетичних моделей не мав статистичної значущості.

*Аналіз за звичкою палити.* Частоти різних алельних варіантів за однонуклеотидними поліморфізмами rs997509 та rs1044498 досліджуваного гена в групах порівняння після розподілу їх на тих, які палять, та тих, які не мають цієї шкідливої звички, наведені в таблиці 3.2.13 [146]. Розподіл генотипів за поліморфним сайтом першого інтрона гена *ENPP1* у пацієнтів, які палять хворих на ЦД 2-го типу, був таким: осіб із С/С-генотипом було 84,2 %, а з С/Т + Т/Т – 15,8 %, це співвідношення серед осіб контрольної групи становило 92,6 і 7,4 % ( $\chi^2 = 2,714$ ;  $P = 0,099$ ). Серед пацієнтів, які не палять, порівняння частоти різних генотипів продемонструвало близьку до рівня статистичної значущості відмінність між пацієнтами з ЦД 2-го типу та особами контролю ( $\chi^2 = 3,526$ ;  $P = 0,060$ ).

**Таблиця 3.2.13 – Розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена ENPP1 у пацієнтів із ЦД 2-го типу та в контрольній групі залежно від звички палити**

Генотип	Палять		Не палять	
	ЦД (%)	контроль (%)	ЦД (%)	контроль (%)
rs997509				
С/С	64 (84,2)	75 (92,6)	218 (90,5)	210 (95,0)
С/Т + Т/Т	12 (15,8)	6 (7,4)	23 (9,5)	11 (5,0)
$\chi^2$	2,714		3,526	
$P$	0,099		0,060	
rs1044498				
К/К	43 (56,6)	54 (66,7)	145 (60,2)	151 (68,3)
К/Q + Q/Q	33 (43,4)	27 (33,3)	96 (39,8)	70 (31,7)
$\chi^2$	1,690		3,334	
$P$	0,194		0,068	

Примітка:  $n$  – кількість осіб у підгрупі;  $P$  – статистична значущість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Щодо аналізу частоти різних варіантів генотипів (K/K- і K/Q + Q/Q) за поліморфним сайтом четвертого екзона досліджуваного гена, одержані подібні результати серед курців ( $\chi^2 = 1,690$ ;  $P = 0,194$ ) та пацієнтів, які не палять ( $\chi^2 = 3,334$ ;  $P = 0,068$ ). Результати дослідження асоціації вивчених поліморфізмів гена *ENPP1* із розвитком цукрового діабету 2-го типу в осіб, які палять, у рамках різних моделей успадкування наведені в таблиці 3.2.14. З'ясовано, що досліджувані поліморфні сайти не впливають на ризик виникнення діабету ( $P > 0,05$ ). Після поправки на стать, вік, ІМТ, ожиріння та АГ значення  $P$  не мало статистичної значущості ( $P_{\text{попр}} > 0,05$ ).

Таблиця 3.2.14 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* з ЦД 2-го типу в курців з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	CT vs CC	0,107	2,344 (0,832–6,599)	0,152	2,353 (0,729–7,594)
rs1044498	KQ 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)
	QQ vs K/K	0,638	1,444 (0,313–6,676)	0,886	0885 (0,167–4,704)

Примітка. Див. таблицю 3.2.2

*Аналіз за супутньою артеріальною гіпертензією.* У таблиці 3.2.15 наведений розподіл генотипів за SNP rs997509 та rs1044498 серед представників дослідної та контрольної груп після їх поділу на когорти, утворені залежно від наявності чи відсутності супутньої артеріальної гіпертензії [146]. Показано, що існує достовірна відмінність щодо розподілу генотипів (C/C і CT + T/T) за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* між пацієнтами із ЦД 2-го типу та контролем у підгрупі із супутньою

артеріальною гіпертензією ( $\chi^2 = 6,161$ ;  $P = 0,013$ ). Так, серед пацієнтів із діабетом осіб із супутньою АГ було 89,5 та 10,5 %, а в контролі – 96,6 та 3,4 % відповідно. У підгрупі з нормальним артеріальним тиском статистичної значущості в розподілі виявлено не було ( $\chi^2 = 1,646$ ;  $P = 0,199$ ).

Порівняння частоти різних генотипів за поліморфним сайтом четвертого екзона гена *ENPP1* серед осіб із супутньою артеріальною гіпертензією продемонструвало відсутність статистичної значущості щодо відмінності між пацієнтами з ЦД 2-го типу та особами контролю ( $P = 0,159$ ). Також не було встановлено відмінності щодо розподілу генотипів між групами порівняння серед осіб із відсутньою АГ в анамнезі ( $P = 0,161$ ).

**Таблиця 3.2.15 – Розподіл генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* у пацієнтів із ЦД 2-го типу та в контрольній групі залежно від наявності супутньої артеріальної гіпертензії**

Генотип	АГ (+)		АГ (-)	
	ЦД (%)	контроль (%)	ЦД (%)	контроль (%)
rs997509				
C/C	214 (89,5)	140 (96,6)	68 (87,2)	145 (92,4)
C/T + T/T	25 (10,5)	5 (3,4)	10 (12,8)	12 (7,6)
$\chi^2$	6,161		1,646	
P	0,013		0,199	
rs1044498				
K/K	141 (59,0)	96 (66,2)	47 (60,3)	109 (69,4)
K/Q + Q/Q	98 (41,0)	49 (33,8)	31 (39,7)	48 (30,6)
$\chi^2$	1,196		1,964	
P	0,159		0,161	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

У таблиці 3.2.16 наведені результати вивчення зв'язку між rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* та розвитком цукрового діабету 2-го типу в осіб із супутньою артеріальною гіпертензією за допомогою методів логістичної регресії. Цей аналіз продемонстрував, що серед осіб з артеріальною гіпертензією носіїв T-алеля за SNP rs997509 ризик розвитку

цукрового діабету був у 3,2 раза вищим (95 % CI = 1,223–8,746;  $P_{\text{спост}} = 0,018$ ), ніж у гомозигот за основним С-алелем (відповідно до моделі СТ vs CC). Ці результати підтверджувалися після врахування віку, статі, ІМТ, ожиріння та звички пацієнта палити (OR = 2,792; CI = 1,023–7,622;  $P_{\text{попр}} = 0,045$ ). Результати вивчення асоціації rs1044498-поліморфізму в рамках різних моделей успадкування не виявили впливу даного SNP на ризик розвитку ЦД 2-го типу в пацієнтів із супутньою АГ як до, так і після врахування факторів ризику діабету ( $P > 0,05$ ).

Таблиця 3.2.16 – Аналіз зв'язку rs997509- та rs1044498-поліморфізмів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу в осіб з артеріальною гіпертензією з урахуванням різних моделей успадкування

SNP	Модель	$P_{\text{спост}}$	OR <sub>спост</sub> (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR <sub>попр</sub> (95 % CI)
rs997509	СТ 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. Див. таблицю 3.2.2

Отже, вплив поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу має вікові особливості. Установлено, що серед осіб старше 75 років, носіїв мінорного Т-алеля за rs997509-поліморфізмом ризик виникнення діабету в 4,5 раза (OR<sub>спост</sub> = 4,561; CI = 1,040–20,014) вищий порівняно з гомозиготами за основним С-алелем.

Вивчаючи гендерні особливості в розподілі генотипів за вивченими поліморфізмами гена *ENPP1*, виявлена достовірна відмінність серед жінок,

хворих на ЦД 2-го типу, та осіб контрольної групи. Жінки із СТ-генотипом за rs997509-поліморфізмом мають утричі вищий ризик розвитку цукрового діабету ( $P_{\text{спост}} = 0,031$ ;  $OR_{\text{спост}} = 3,038$ ). У рамках домінантної моделі (KQ/QQ vs K/K) успадкування за rs1044498-поліморфізмом також виявлена асоціація зазначеного поліморфного локусу з ризиком діабету в жінок ( $P_{\text{спост}} = 0,033$ ;  $OR_{\text{спост}} = 1,750$ ).

Аналізуючи зв'язок поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 із розвитком цукрового діабету 2-го типу, враховуючи супутню патологію, встановили достовірну відмінність щодо розподілу генотипів за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* серед осіб з ожирінням у групі цукрового діабету та контролі ( $P = 0,024$ ). В осіб з ожирінням носіїв мінорного Т-алеля ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу значно вищий, ніж у гомозигот за основним С-алелем ( $OR = 3,230$ ;  $P = 0,023$ ).

### 3.3. Поєднаний вплив однонуклеотидних поліморфізмів (rs997509 та rs1044498) гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу

Вивчення комплексного впливу rs997509- та rs1044498-поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу в групах порівняння було наступним кроком нашого дослідження. Виявилось, що локуси зазначених SNP перебувають у міцному нерівноважному зчепленні ( $D' = 0,970$ ;  $r^2 = 0,157$ ). Це дозволило визначити частоту гаплотипів, що утворюють rs997509- та rs1044498-поліморфізми гена *ENPP1*, і провести аналіз їх асоціації з розвитком ЦД 2-го типу (табл. 3.3.1).

Таблиця 3.3.1 – Аналіз розподілу гаплотипів гена *ENPP1* у хворих із ЦД 2-го типу та осіб контрольної групи

Гаплотип	ЦД		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

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 зустрічався 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 ( $P = 0,128$ ).

Наступним 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 багатofакторної розмірності (MDR) [143]. 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 AC&CT, 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). На рисунку 3.3.1 подана комбінація генотипів за поліморфними сайтами rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1*.

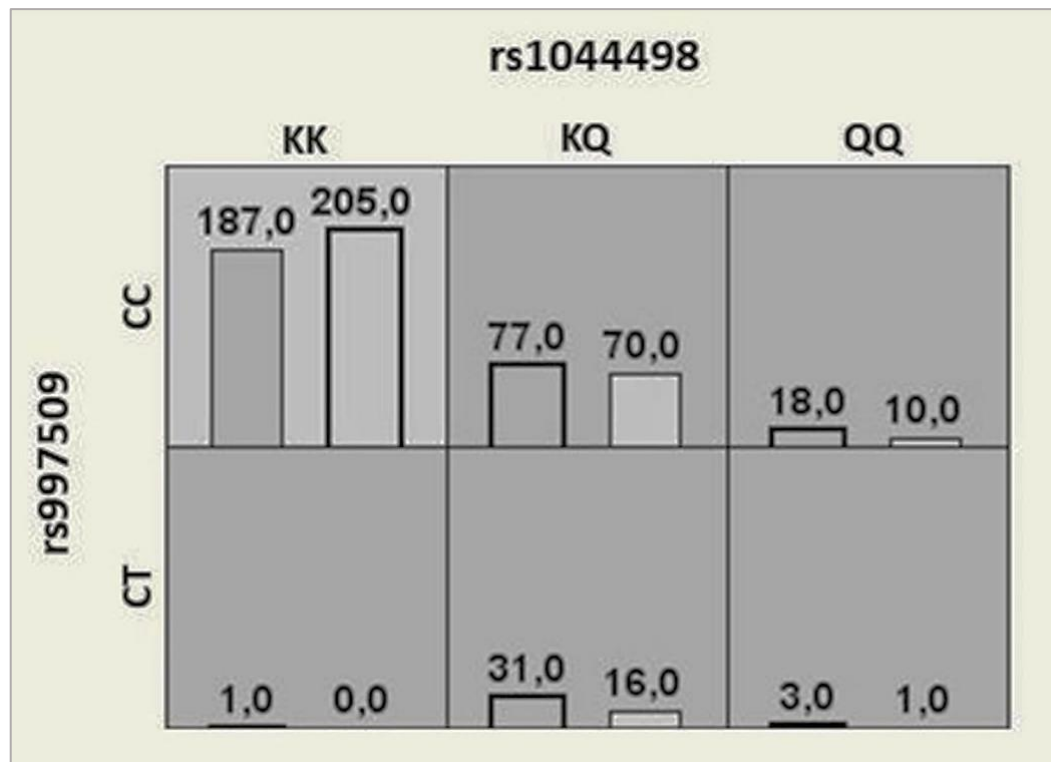


Рисунок 3.3.1 – Комбінації генотипів за поліморфізмами rs997509 та rs1044498, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику розвитку ЦД 2-го типу. Лівий стовпчик у межах кожної комірки відображає кількість випадків діабету, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі комірки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ЦД 2-го типу

Виявлено, що збіг гетерозигот (K/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) за SNP rs1044498 та одним із будь-яких можливих генотипів (C/C або C/T) 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 і дорівнює 0,70 та 0,71 % відповідно (рис. 3.3.2).

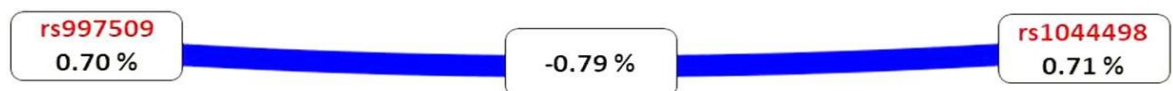


Рисунок 3.3.2 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу

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 однонуклеотидних 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 (рис. 3.3.3).



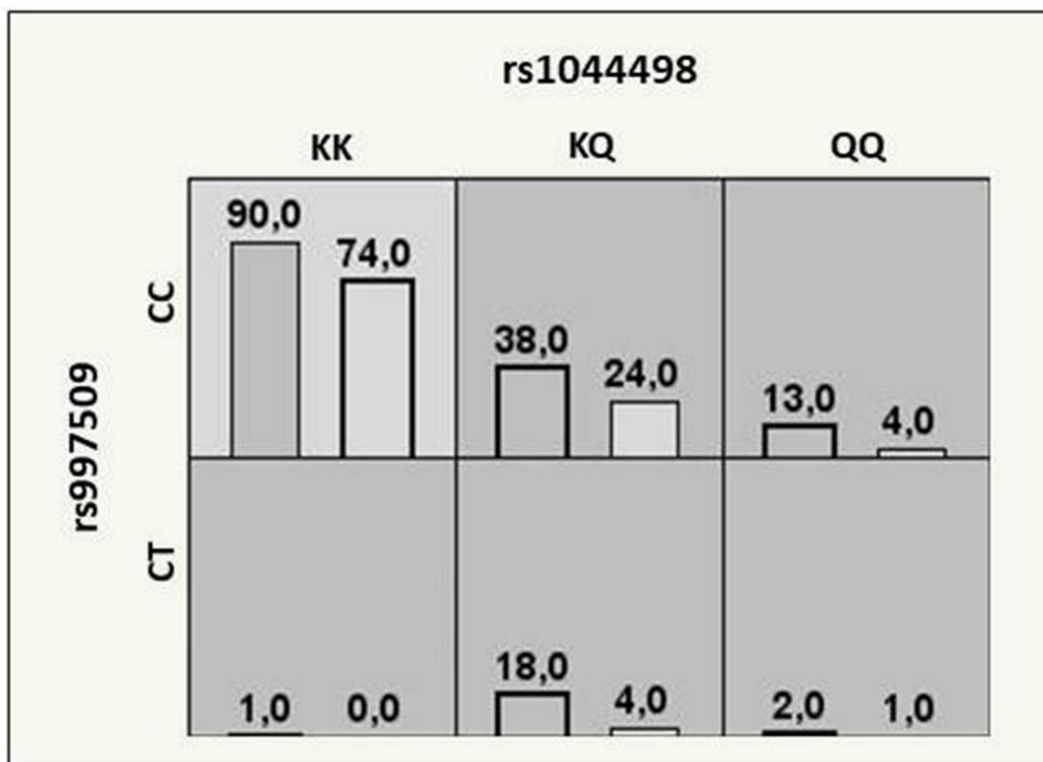


Рисунок 3.3.3 – Комбінації генотипів за поліморфізмами rs997509 та rs1044498, що пов'язані з високим та низьким рівнями ризику розвитку ЦД 2-го типу в осіб жіночої статі (пояснення див. на рис. 3.3.1)

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 %) (рис. 3.3.4).

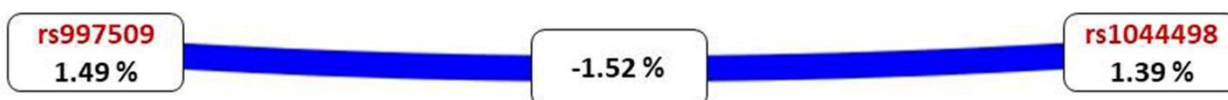


Рисунок 3.3.4 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу в осіб жіночої статі

Під час вивчення міжлокусних взаємодій виявили виражений нейтралізуючий ефект між досліджуваними SNP гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1. 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 (рис. 3.3.5). На тестованій вибірці така модель мала прогностичну здатність 48,8 % (крос-перевірна здатність – 10/10).

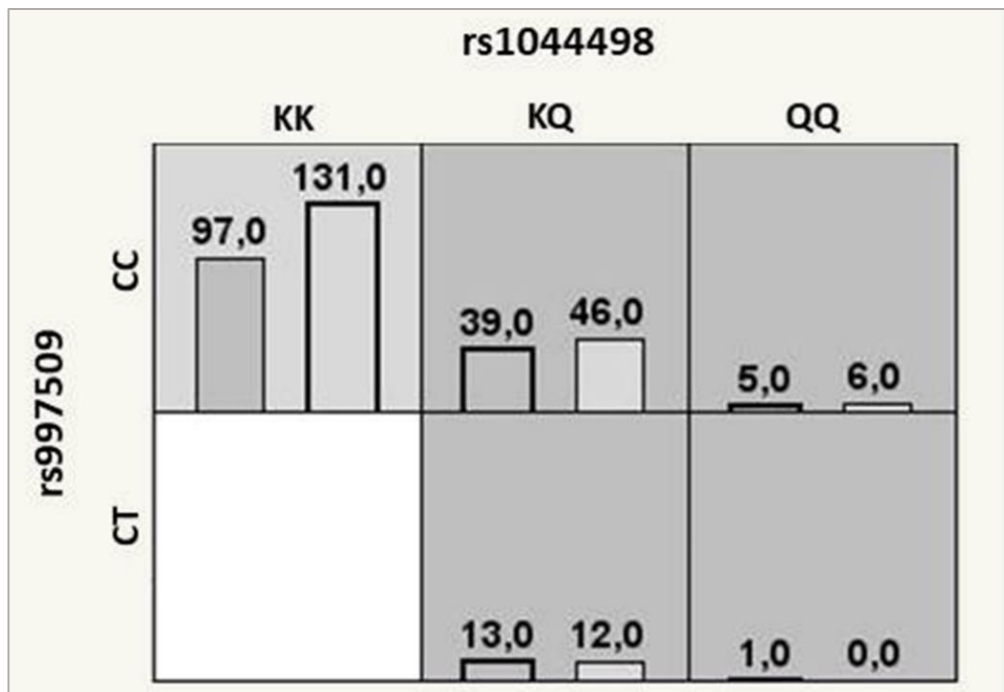


Рисунок 3.3.5 – Комбінації генотипів за поліморфізмами rs997509 та rs1044498, пов'язаними з високим та низьким рівнями ризику розвитку ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі (пояснення див. на рис. 3.3.1)

На рисунку 3.3.6 наведений кластерний аналіз результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі. Показники нейтралізуючого ефекту були нижчими, ніж у загальній групі та окремо в осіб жіночої статі, і становили  $-0,22\%$ . Статистична значущість цієї моделі в чоловіків за результатами пермутаційних тестів підтверджена не була ( $P = 0,369$ ).

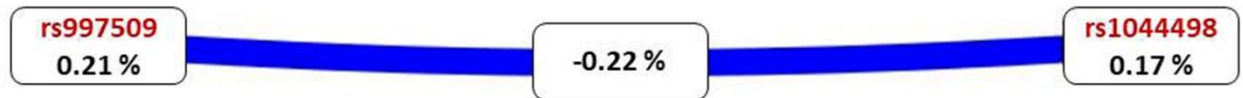


Рисунок 3.3.6 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу в осіб чоловічої статі

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 багатofакторної 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) (рис. 3.3.7).

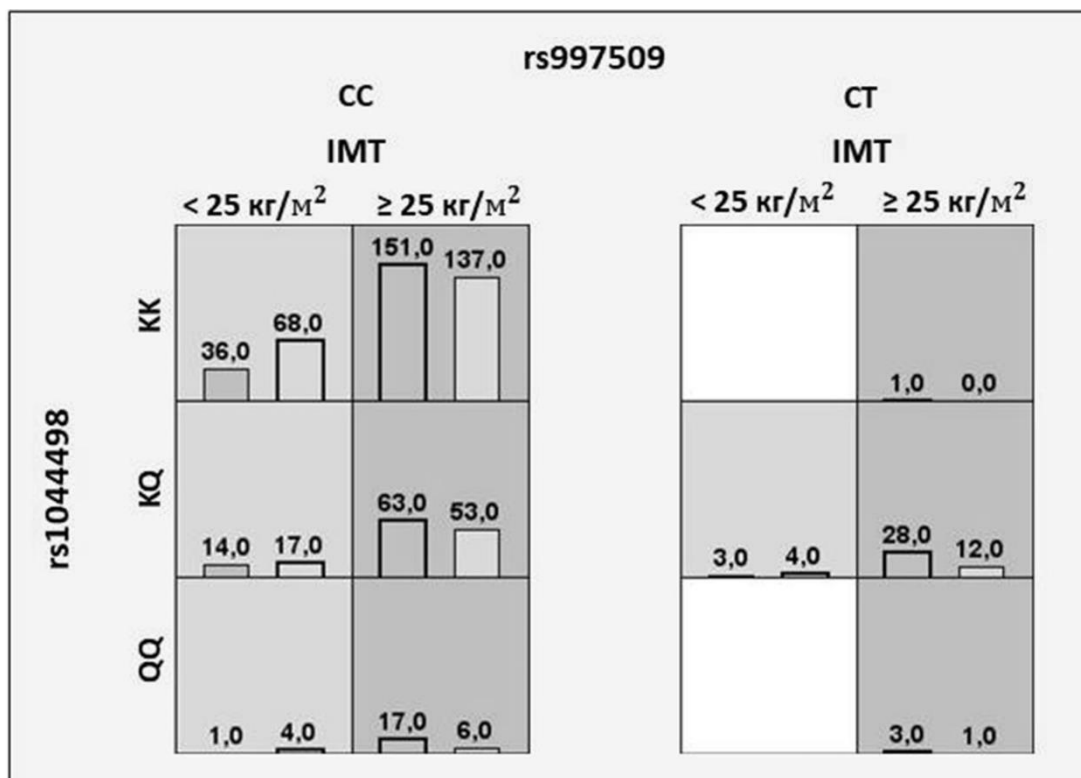


Рисунок 3.3.7 – Комбінації генотипів за індексом маси тіла (ВМІ) та rs997509- і rs1044498-поліморфізмами, пов'язаними з високим та низьким рівнями ризику розвитку ЦД 2-го типу (пояснення див. на рис. 3.3.1)

З одержаних даних бачимо, 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 %) (рис. 3.3.8). 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 ( $P < 0,0001$ ).

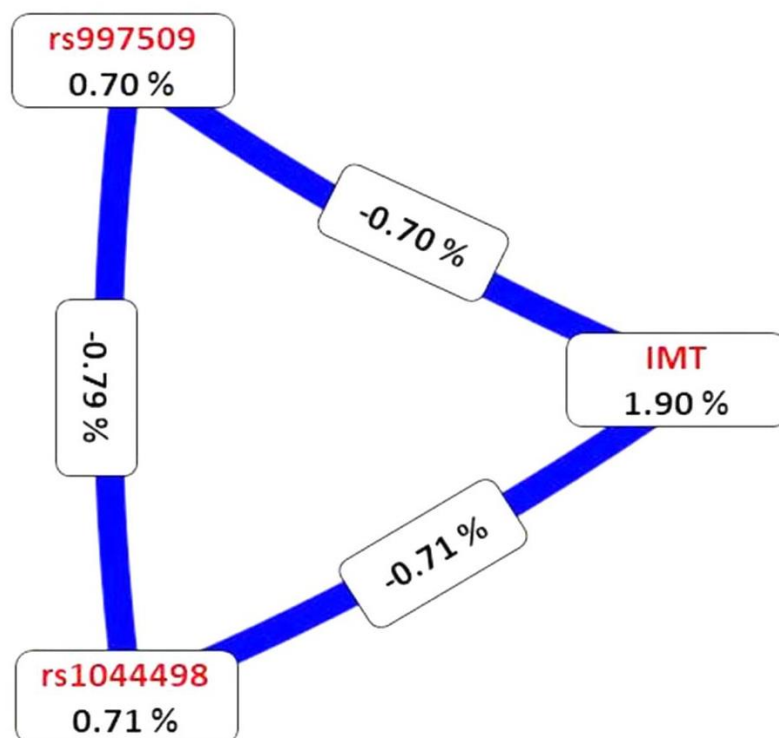


Рисунок 3.3.8 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжфакторної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу

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) (рис. 3.3.9).

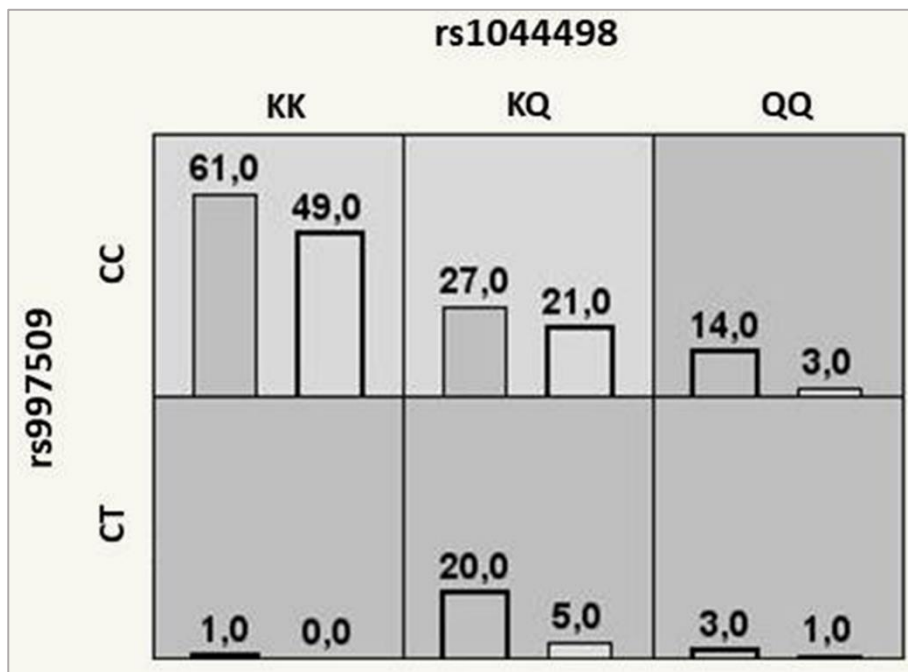


Рисунок 3.3.9 – Комбінації генотипів за rs997509- та rs1044498-поліморфізмами гена *ENPP1* в осіб з ожирінням, пов'язаними з високим та низьким рівнями ризику розвитку ЦД 2-го типу (пояснення див. на рис. 3.3.1)

Комбінація гомозигот за мінорним Q-алелем за rs1044498-поліморфним сайтом та носіїв основного С-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 Т-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) (рис. 3.3.10).



Рисунок 3.3.10 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжлокусної взаємодії методом MDR при ЦД 2-го типу в осіб з ожирінням

Картина міжфакторної взаємодії відзначалася нейтралізуючим ефектом між двома досліджуваними поліморфізмами гена *ENPP1* в осіб з ожирінням (–0,19 %).

Отже, 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). Також встановлено, що в разі поєднання в однієї особи з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> 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.

#### **Матеріали цього розділу висвітлені в таких публікаціях:**

1. Марченко І. В., Дубовик Е. І., Ткач Г. Ф. Асоціація rs997509-поліморфізма гена *ENPP1* с розвитком сахарного діабета 2-го типу в української 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 української 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 поєднаного впливу поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* з розвитком цукрового діабету 2-го типу. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2018. Т. 6, № 2.

C. 278–284. URL: [https://ujcem.med.sumdu.edu.ua/images/sampleddata/2018/2/278284\\_2018-27.pdf](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](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.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Упродовж багатьох років науковці займаються вивченням цукрового діабету, його ускладнень і супутніх патологій. Однак, незважаючи на видатні досягнення у вивченні механізмів розвитку ЦД, а також успіхи в розробленні нових лікарських препаратів для контролю глікемії, проблеми, пов'язані з пізніми ускладненнями, все одно продовжують наростати. Усе це наштовхує на вивчення потенційних маркерів ЦД та ранньої діагностики розвитку і прогресування його ускладнень, а в перспективі – і нових терапевтичних можливостей [148].

Цукровий діабет 2-го типу має складний патогенез, який класично характеризується механізмом виникнення інсулінорезистентності та дисфункцією  $\beta$ -клітин підшлункової залози, зі зменшеною секрецією інсуліну [149]. Співвідношення цих двох компонентів відрізняється серед пацієнтів різних популяцій. Точно сказати, який із механізмів є первинним, а який вторинним, досить складно. Усе залежить від індивідуальних особливостей людини, але існує думка, що зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну передуює появі перших клінічних проявів у середньому на 15 років та є основною ланкою в патогенезі [150].

Тому метою нашої роботи стало з'ясування ролі поліморфізму гена *ENPP1* у виникненні ЦД 2-го типу з урахуванням деяких відомих факторів його ризику (вік, стать, індекс маси тіла, ожиріння, паління, супутня артеріальна гіпертензія).

У результаті проведеного рестрикційного аналізу встановлена частота, з якою зустрічаються алелі та генотипи за двома поліморфними варіантами гена *ENPP1* у хворих з ЦД 2-го типу та осіб групи порівняння.

Розподіл гомозигот за основним алелем (K/K), гетерозигот (K/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) за rs1044498-поліморфним локусом гена



*ENPP1* в осіб групи контролю становив 67,9; 28,5 і 3,6 % відповідно. Частота основного К-алеля становила 0,82, мінорного Q-алеля – 0,18. Подібні результати одержали у своїх дослідженнях учені, які досліджували популяції країн Європи. Rasmussen et al. у жителів Данії виявили, що співвідношення гомозигот за основним алелем К/К, гетерозигот К/Q і гомозигот за мінорним алелем Q/Q серед практично здорових осіб становили 73,9; 24,2 і 1,9 % [151]. Вивчаючи розподіл алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом rs1044498, Barroso et al. виявили, що розподіл генотипів за вивченим поліморфізмом гена *ENPP1* у мешканців Англії був таким: К/К – 77,0 %, К/Q – 21,2 %, і Q/Q – 1,8 % [152]. У дослідженнях D. Meure et al. було виявлено частоту генотипів К/К, К/Q і Q/Q у французькій популяції, яка становила 71,7; 25,5 і 2,8 % [153]. Частота мінорного алеля дорівнювала 0,155, що статистично не відрізнялася від наших результатів дослідження ( $P > 0,05$ ). Щодо української популяції, то лише в праці Розуменко та співавт., які вивчали значення поліморфного сайту rs1044498 із механізмами розвитку гострого коронарного синдрому, одержані результати подібні до наших даних, мінорний Q-алель серед здорових осіб зустрічається з частотою 0,123, а розподіл генотипів був таким: К/К – 75,5 %, К/Q – 24,5 % і Q/Q – 0 % [154].

Поліморфний сайт rs997509 гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 відіграє певну роль у розвитку ряду патологічних процесів та хвороб, серед яких і цукровий діабет 2-го типу. Результати генотипування осіб контрольної групи за поліморфним сайтом rs997509 гена *ENPP1*, які ми одержали, показали, що співвідношення гомозигот С/С, гетерозигот С/Т та гомозигот Т/Т у ній становить 94,4; 5,6 і 0,0 % відповідно. «Дикий» С-алель у зазначеній групі має частоту 0,97, а мінорний Т-алель – 0,03.

Розподіл алелів за вивченим поліморфізмом серед жителів європейських країн є подіним. Було показано, що в поляків мінорний Т-алель

зустрічається з частотою 0,027, а в італійців частота Т-алеля становить 0,06 [155]. Натомість порівнюючи наші результати з даними, одержаними Matsha et al., бачимо, що розподіл генотипів серед мешканців Африки достовірно відрізняються ( $P = 0,0001$ ): Т-алель серед здорових осіб зустрічається з частотою 0,119, а співвідношення гомозигот С/С, гетерозигот С/Т та гомозигот Т/Т у ній становить 77,4; 21,4 і 1,2 % відповідно [156].

Одержані на сьогодні результати дають підстави вважати, що частоти алелів за одонуклеотидними поліморфізмами rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1*, які ми виявили серед населення Північно-Східного регіону України, відповідають таким у більшості популяцій країн Європи.

Вивчаючи розподіл алелів та генотипів за поліморфними варіантами гена *ENPP1* у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу, одержали, що співвідношення К/К-, К/Q- та Q/Q-генотипів за rs1044498 становило в цій групі 59,3; 34,1 і 6,6 % відповідно. Розподіл С/С-, С/Т- та Т/Т-варіантів за rs997509 серед хворих на ЦД 2-го типу становив 89,0; 11,0 і 0,0 % відповідно. Порівняльний аналіз наведених даних із результатами генотипування осіб контрольної групи показав, що існує зв'язок між виникненням ЦД 2-го типу та поліморфними варіантами rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1*. Було з'ясовано, що в носіїв мінорного Q-алеля за поліморфізмом 4-го екзона гена *ENPP1* ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу в 1,4 раза вищий, ніж у гомозигот К/К. Поряд із цим у носіїв Т-алеля за поліморфним сайтом 1-го інтрона гена *ENPP1* ризик ЦД був удвічі вищий, ніж у носіїв основного С-алеля. Необхідно зазначити, що статистична значущість цих результатів зберігалась і після врахування статі, віку, ІМТ, наявності супутньої АГ та звички палити.

Результати досліджень інших авторів, які займалися пошуком зв'язку поліморфних варіантів гену ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 із розвитком цукрового діабету 2-го типу доволі суперечливі та неоднозначні.

З одного боку, є низка доказів того, що зв'язок між різними поліморфними варіантами гена *ENPP1* та розвитком цукрового діабету 2-го типу існує, як і за результатами наших досліджень. За даними, одержаними в метааналізі, проведеним McAteer et al., вивчаючи асоціацію rs1044498-поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком ЦД 2-го типу в європейській популяції, дійшли висновку, що світлошкірі європейці, гомозиготи за мінорним Q-алелем, хворіють на цукровий діабет у 1,38 раза частіше [157]. Vochenski et al. повідомили, що в польській популяції носії Q-алеля rs1044498- (частота 1,6) або T-алеля rs997509-поліморфізмів (частота 4,7) більш схильні до цього захворювання [158]. Vadaruddoza et al. була проаналізована наявність асоціації поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в індійській популяції, в результаті цього автори показали, що ризик розвитку ЦД в осіб із Q/Q-генотипом за зазначеним поліморфним сайтом є достовірно вищим, ніж у носіїв K/K-генотипу [159]. Подібні результати асоціації rs1044498-поліморфізму гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу одержали у своїх працях Abate et al., досліджуючи європейську популяцію країн Південної Азії та США, Namaguchi et al. – в жителів Домінікани та Meure et al. – у французькій популяції [160–162]. Результати, які ми одержали, підтверджуються і в проведеному Tang S. et al. метааналізі, що ґрунтується на результатах досліджень 40 наукових праць у різних популяціях світу. Показано, що для загальної групи пацієнтів був установлений достовірний зв'язок між rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* і ЦД 2-го типу під час порівняння носіїв Q-алеля з K-алелем (OR = 1,29; 95% CI = 1,16–1,44; P = 0,001) [163]. З огляду на той факт, що порівнювали пацієнтів різної етнічної належності, ця асоціація була підтверджена окремо для пацієнтів європейського й 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 в європейців й азіатів.

Щодо результатів генотипування за rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1*, то Yako et al. у своїй праці продемонстрували, що цей поліморфний сайт у 1,43 раза збільшує ризик розвитку ЦД 2-го типу в осіб-носіїв мінорного Т-алеля в африканській популяції. Цей поліморфізм 1-го нітрону гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази був асоційований з іншими патологічними станами, розвиток яких пов'язаний з інсулінорезистентністю [164]. Так, Santoro et al., вивчаючи асоціацію поліморфного варіанта rs997509 гена *ENPP1* із метаболічним синдромом (МС) та порушенням толерантності до глюкози в дітей з ожирінням, виявили, що носії мінорного Т-алеля мали більший ризик виникнення МС – у 2,4 раза, а порушення толерантності до глюкози – у 4,7 рази, ніж гомозиготи за С-алелем [165].

З іншого боку, Rasmussen et al., досліджуючи асоціацію rs1044498-поліморфізму гена *ENPP1* з інсулінорезистентністю та ЦД 2-го типу в жителів Данії, не знайшли значущої відмінності щодо розподілу генотипів за зазначеним поліморфним сайтом між пацієнтами з ЦД 2-го типу та контрольною групою [151]. Поряд із цим у дослідженнях, виконаних в Європі Pizzutti et al., вивчаючи популяцію Сицилії, Gu et al. – жителів Фінляндії і Швеції, Kubaszek et al. – фінську популяцію не виявили асоціації між генетичним поліморфізмом гена *ENPP1* та розвитком цукрового діабету 2-го типу [166–168]. Tripathi et al. також не виявили зв'язку між вивченим поліморфізмом і діабетом в індійській популяції [169].

Одержані на сьогодні результати дають підстави вважати відмінності розподілу генотипів за зазначеними поліморфізмами не стільки популяційними, скільки расовими. А також велику роль відіграє вплив соціально-економічного статусу країни. Це сприяє розвитку цукрового діабету 2-го типу через процеси, пов'язані з відсутністю доступу до медичних послуг, здорової їжі, місць для тренувань та професійних можливостей, що призводять до нездорового способу життя.

Продовжуючи тему зв'язку досліджуваних SNP, бачимо інтерес учених до вивчення асоціації їх із різними патологічними станами та хворобами, таких як синдром Марфана, генералізована артеріальна кальцифікація, гіпофосфатемічний вітамін-Д-резистентний рахіт, ожиріння, скелетні дисплазії з аномальною мінералізацією, спадкові захворювання нирок та інших. Так, група дослідників із Сербії довели вплив поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* на розвиток ішемічної хвороби серця [170]. Мешканці Сербії, в яких у геномі є мінорний алель (K/Q + Q/Q), мають високий рівень розвитку ІХС, а саме на 78 % вищий від гомозигот за основним алелем. Згідно з працями німецьких учених поліморфізм rs1044498 пов'язаний із розвитком псевдоксантоми в мешканців Німеччини. Особи-носії мінорного алеля мають більший ризик розвитку захворювання, аніж особи гомозиготи за основним алелем [171]. Виникнення гіпофосфатемічного рахіту, зумовлене поліморфізмом rs1044498 гена *ENPP1*, доведено вченими для популяції Америки [172]. Учені Кореї довели зв'язок цього поліморфізму з розвитком кальцифікації аортального клапану у хворих на ЦД 2-го типу для корейського населення [173]. Згідно з дослідженнями останніх розподіл генотипів серед пацієнтів із кальцифікацією аорти з К/К-генотипом було 76,2 %, із К/Q + Q/Q-генотипом – 23,8 %. Розподіл генотипів (К/К і К/Q + Q/Q), які не хворіють на кальцифікацію аорти, становив 86,5 і 13,5 % відповідно ( $P = 0,036$ ). Тобто дослідження J. E. Lee et al. у корейській популяції серед хворих із ЦД продемонстрували, що існує зв'язок між кальцифікацією аорти і rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1*. Також відомо про зв'язок rs1044498-поліморфізму з розвитком інфаркту міокарда, що був доведений єгипетськими вченими [174]. Останні довели, що особи-носії мінорного алелю (К/Q + Q/Q) мають у 3 рази вищий ризик розвитку інфаркта міокарда, ніж особи з генотипом К/К. Такий зв'язок був виявлений і вченими Німеччини. Вони встановили, що ризик виникнення інфаркту міокарда в носіїв мінорного алеля в 4,5 раза більший, ніж у носіїв основного алеля в

німецького населення [175]. Під час дослідження в українській популяції асоціації rs1044498-поліморфізму гена *ENPP1* Розуменко з колегами встановили, що носії мінорного Q-алеля мають достовірно вищий рівень ризику виникнення гострого коронарного синдрому, ніж гомозиготи K/K [176]. У літературі є дані про асоціацію rs997509-поліморфізму 1-го інтрона гена *ENPP1* з метаболічним синдромом, ожирінням та інсулінорезистентністю. Так, Vochenski J. et al. показали, що rs997509-поліморфізм асоційований з високим ризиком розвитку ЦД 2-го типу у осіб з ожирінням у польській популяції [158]. Santoro N. et al. у своїй праці описали вплив rs997509-поліморфізму *ENPP1* на розвиток метаболічного синдрому і порушення толерантності до глюкози у дітей з ожирінням, які є носіями мінорного T-алеля за rs997509-поліморфізмом, а також зафіксували 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) [128]. Автори зробили висновок про те, що T-алель за rs997509-поліморфізмом може бути асоційований із розвитком метаболічного синдрому та інсулінорезистентності у дітей з ожирінням. У дослідженні групи Т. Matsha виявлена значна відмінність щодо співвідношення T-алеля rs997509 між пацієнтами з ожирінням і контрольною групою ( $P = 0,010$ ) у південноафриканській популяції [156]. Автори стверджують, що наявність T-алеля за rs997509-поліморфізмом підвищує ризик ожиріння в його носіїв ( $P = 0,024$ ).

Як відомо, виникнення ЦД 2-го типу пов'язане з дією багатьох факторів ризику, такі як вік, стать, ожиріння, паління, вживання алкоголю, супутня артеріальна гіпертензія та гестаційний діабет в анамнезі.

З віком поширеність цукрового діабету 2-го типу зростає, що підтверджуються результатами досліджень National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) [177]. У більшості популяцій захворюваність

на ЦД 2-го типу віком до 30 років низька, але швидко й безперервно зростає в осіб старшого віку [178, 179]. Сучасні спостереження свідчать про те, що вік є сильним фактором ризику, незалежно від основних корельованих факторів ризику життя, враховуючи ожиріння.

Стать є суперечливим фактором ризику діабету. За даними European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), підвищений ризик цукрового діабету в чоловіків порівняно з жінками спостерігався в різних європейських країнах [180]. Проте серед населення Сполучених Штатів ця закономірність не була настільки яскраво виражена, оскільки рівень захворюваності на діабет серед чоловіків порівняно з жінками був вищим у 2010 році, але нижчим у 2013 році, на основі даних National Health Interview Survey (NHIS).

Що стосується відмінності розподілу генотипів за вивченими поліморфізмами гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 серед осіб різної статі та гендерної схильності до ЦД 2-го типу. Після поправки на вік, ІМТ, артеріальну гіпертензію та паління виявилось, що жінки, які є носіями мінорного Т-алеля за поліморфним локусом rs997509 гена *ENPP1*, мають утричі вищий ризик розвитку ЦД 2-го типу, ніж особи жіночої статі з С/С-генотипом. У подібних дослідженнях Tanyolaç S et al. виявили, що ризик ожиріння, яке є одним із факторів ризику ЦД 2-го типу, в чоловіків, носіїв мінорного Q-алеля, турецького населення значно вище, ніж у жінок такого самого генотипу [181]. У дослідженнях, проведених в китайській популяції Хань, продемонстровано зв'язок Q121-поліморфного локусу гена *ENPP1* з ожирінням в інсулінорезистентних осіб і виявлено в жінок вищий ризик виникнення ожиріння.

Одним із найбільш значущих серед факторів ризику цукрового діабету є ожиріння. Так, за даними Nurses' Health Study, 61 % випадків цього захворювання можна пов'язати з надмірною масою тіла ( $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$ ), що

пояснюється концепцією «хронічного запального процесу низької інтенсивності».

Після розподілу представників обох груп порівняння на осіб із нормальною та надмірною вагою ми встановили, що в осіб із  $IMT \geq 25$   $kg/m^2$  існує зв'язок між rs997509-поліморфізмом гена *ENPP1* та розвитком ЦД 2-го типу. Виявлено, що в пацієнтів із підвищеним ІМТ, які є носіями мінорного Т-алеля, ризик розвитку цукрового діабету в 2,2 раза вищий, ніж у власників генотипу С/С. А у хворих з ожирінням в анамнезі ризик збільшувався у 3,2 раза після поправки на вивчені фактори ризику діабету. Також було показано, що в осіб з Q/Q-генотипом за SNP rs1044498 ризик розвитку ЦД 2-го типу зростає в 1,8 раза порівняно з носіями мажорного алеля.

Що стосується асоціації поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в пацієнтів із різною величиною ІМТ за результатами досліджень вчених з інших країн, то згідно з N. Matsuoka et al. поліморфізм rs1044498 гена *ENPP1* не асоційований із підвищеним ІМТ в європейській і афроамериканській популяціях [182]. Так, розподіл генотипів (К/К, К/Q і Q/Q) у європейців, які не страждають на ожиріння, становило: 59,2; 36,1 і 4,7 %. Серед тих, хто мав  $IMT \geq 25$   $kg/m^2$ , частота генотипів була 70,2; 24,6 і 5,2 % відповідно ( $P = 0,16$ ). В афроамериканській популяції серед тих, хто мав нормальну вагу, пацієнтів із К/К-, К/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, які мали генотип К/К, ІМТ був вищий, ніж у носіїв мінорного Q-алеля ( $P < 0,001$ ). У своїх дослідженнях К. Hamaguchi et al. у домініканській ( $P > 0,05$ ) [183], S. K. Rasmussen et al. у данській ( $P > 0,05$ ) [184], а J. L. González-Sánchez et al. в іспанській ( $P > 0,05$ ) популяціях [185] не встановили асоціації поліморфізму rs1044498 гена *ENPP1* з ожирінням у хворих на ЦД 2-го типу, але діапазон величини ІМТ у цих дослідженнях був між 24 і 28  $kg/m^2$ .



Група дослідників Bochenski et al., вивчаючи вплив поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу серед польського населення, показали, що пацієнти дослідної групи із супутнім ожирінням в анамнезі мають значно вищий ризик зазначеного захворювання [158]. Носії Т-алеля за SNP rs997509 хворіють на ЦД 2-го типу в 4,7 раза частіше, а носії Q-алеля за SNP rs1044498 – у 1,6 раза порівняно з контрольною групою. Вассі et al. під час вивчення впливу K121Q-поліморфного сайту гена *ENPP1* на розвиток кардіоваскулярної патології в пацієнтів із високим ризиком встановили, що в осіб з ожирінням із 121Q-генотипом діабет виникає в майже в 6 разів частіше порівняно з пацієнтами з нормальною вагою [131]. У результаті дослідження населення Південної Африки Yako et al. дійшли висновку, що в носіїв мінорного Т-алеля за SNP rs997509 ризик виникнення ЦД 2-го типу вищий у 4,6 раза, незважаючи на розподіл групи пацієнтів за показниками ІМТ [139].

Відмінність одержаних даних можна пояснити расовою та етнічною належністю до діабету та через відмінності щодо поширення ожиріння, поведінкових факторів ризику та соціально-економічного статусу. В азіатів, латиноамериканців та афроамериканців ризик ЦД значно вищий порівняно з білошкірими етнічними групами, навіть після поправки таких факторів, як ІМТ, фізична активність, дієта та спосіб життя [186].

За даними ВООЗ, сьогодні на планеті палить близько 1,3 мільярда людей, з яких 7 млн – українці. Паління як фактор ризику ЦД вивчалось в рамках метааналізу 25 проспективних когортних досліджень, зокрема 1,2 млн учасників із США, Європи та Азії з 45 844 випадками захворювання. Під час спостереження в період від 5 років до 30 років, активні курці мали підвищений ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу порівняно з особами, які не палять у 1,4 раза [187]. Крім того, співвідношення доза – відповідь спостерігалось між палінням та цукровим діабетом 2-го типу. Більш активні курці мали вищий ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу

(OR = 1,61; 95% CI = 1,43–1,80), тоді як асоціації були слабшими для осіб, які палять менше (OR = 1,29; 95% CI = 1,13–1,48) та для колишніх курців (OR = 1,3; 95 % CI = 1,14–1,33). Припинення паління було пов'язане з короткочасним збільшенням ризику діабету, який значною мірою опосередковано через збільшення ваги [188]. Вплив пасивного паління на роботі або вдома також пов'язаний із підвищеним ризиком розвитку діабету [189].

У роботі, яку ми проводили, щодо асоціації досліджуваних поліморфізмів гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу, не було виявлено статистично значущого зв'язку як серед осіб, які не палять, так і серед курців. Подібні результати одержали Tripathi et al., які також не виявили залежності між генотипом за rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* та палінням серед населення Індії [190].

Основний механізм, за допомогою якого споживання сигарет підвищує ризик діабету 2-го типу, не є повністю зрозумілим. У подвійному сліпому, перехрещеному, плацебоконтрольованому, рандомізованому експериментальному дослідженні введення нікотину посилює резистентність до інсуліну в осіб із діабетом 2-го типу, але не серед учасників контрольної групи [191]. Тому, швидше за все, сигаретний дим не ініціює ЦД 2-го типу, а сприяє його прогресуванню. Крім того, було припущено, що нікотин або інші компоненти сигаретного диму можуть безпосередньо викликати травми підшлункової залози [192] і впливати на секрецію інсуліну, викликаючи оксидативний стрес у підшлунковій залозі, що згодом може призвести до втрати функції  $\beta$ -клітин [193].

Між уживанням алкоголю та виникненням цукрового діабету 2-го типу існує дозозалежна закономірність [194]. Метааналіз 20 прогностичних когортних досліджень (дев'ять із США, шість з Європи, три з Азії та два з Австралії) демонструє, що вживання невеликої кількості алкоголю (24 г на добу для жінок та 22 г на добу для чоловіків) захищає від ЦД 2-го типу.

Проте ризик цукрового діабету 2-го типу був особливо високим за високого рівня вживання алкоголю (понад 50 г на день для жінок та 60 г для чоловіків). Тому автори прийшли до висновку, що помірне споживання алкоголю є захисним фактором від діабету 2-го типу. Крім того, помірне споживання алкоголю зменшує позитивний зв'язок між дієтичним глікемічним навантаженням та ризиком діабету [195]. Дослідники EPIC-InterAct повідомили, що зв'язок уживання алкоголю з розвитком цукрового діабету 2-го типу більш виражений серед жінок [196]. Залежно від типу алкоголю існують дані, що вживання вина найбільш сильно пов'язане зі зменшенням ризику діабету 2-го типу [196, 197].

Артеріальна гіпертензія також вважається фактором ризику цукрового діабету 2-го типу. Відомо, що у хворих на діабет з супутньою АГ істотно підвищується кардіоваскулярний ризик, спостерігається зростання розвитку серцево-судинних захворювань, які значно підвищують смертність серед цієї категорії пацієнтів [198]. Крім того, роль АГ як фактора ризику мікро- та макросудинних ускладнень ЦД підтверджена також результатами проспективного дослідження із залученням пацієнтів, хворих на ЦД 2-го типу – UKPDS [199]. Зниження величини систолічного АТ на 10 мм рт. ст. призводить до зменшення ризику розвитку всіх ускладнень діабету на 12 %, смертності, зумовленої ЦД 2-го типу – на 15 %, мікросудинних ускладнень – на 13 %.

У нашій роботі був проведений аналіз асоціації SNP rs997509 та rs1044498 гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 із розвитком ЦД 2-го типу окремо серед осіб без та із супутньою артеріальною гіпертензією. Було встановлено, що серед осіб з АГ, носіїв Т-алеля за поліморфізмом 1-го інтрона rs997509, ризик розвитку цукрового діабету був у 3,2 раза вищим, ніж у гомозигот за основним С-алелем. Значущість наведених результатів зберігалась і після урахування факторів ризику діабету. Результати вивчення асоціації поліморфізму rs1044498 не виявили

впливу даного SNP на ризик розвитку ЦД 2-го типу в пацієнтів як із супутньою, так і без АГ в анамнезі. D. Zhou et al. у своїх працях відзначили вплив на розвиток ЦД 2-го типу і АГ таких генів-кандидатів: *ESR*, *KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *ACE*, *CAPN 10* і *ENPP1* [200]. Подібні дані одержали R. Vasudevan et al. у своїх дослідженнях на особах малайзійської популяції [201]. У роботі S. Vassì et al. під час дослідження пацієнтів Сицилії з інсулінорезистентністю, які не мали ожиріння, встановили, що значення АТ в осіб із різними генотипами за rs1044498-поліморфізмом гена *ENPP1* достовірно не відрізнялися, але виявив, що Q121-варіант генотипу передбачає збільшення в 5,94 раза події серцево-судинних захворювань у пацієнтів із діабетом та ожирінням [202]. У праці Taher et al. показано захисний ефект досліджуваного rs1044498-поліморфізму щодо розвитку артеріальної гіпертензії у хворих із ЦД 2-го типу незалежно від типів досліджуваних генотипів у жителів Іраку [203].

Зважаючи на здатність *ENPP1* інгібувати дію інсуліну, ці дані підтверджують роль даного генного поліморфізму щодо порушення жирового та вуглеводного обміну. А розбіжність результатів свідчить про те, що ЦД 2-го типу є мультифакторіальним захворюванням.

Сучасні дослідження щодо пошуку генетичних детермінант цукрового діабету 2-го типу як мультифакторіального захворювання побудовані на гаплотипному аналізі. Це є потужним доповненням ефективності виявлення нових генетичних маркерів хвороби. Складність оброблення та інтерпретації експериментальних даних зменшується за рахунок скорочення кількості статистичних тестів і зниження ймовірності помилкових асоціацій шляхом угруповання тисяч SNP в кілька сотень блоків гаплотипів. Але для створення гаплотипів необхідно використовувати лише ті поліморфні сайти, які виявляють у нерівноважному зчепленні. Тому на початку гаплотипного аналізу ми провели розрахунок LD між досліджуваними поліморфними варіантами rs997509 та rs1044498 гена ектонуклеотид

пірофосфатази/фосфодіестерази 1, у результаті цього ми виявили міцне нерівноважне зчеплення між локусами зазначених SNP ( $D' = 0,970$ ;  $r^2 = 0,157$ ), що узгоджується з даними інших авторів [204]. Це наштовхнуло нас до розрахунку частот гаплотипів за зазначеними поліморфізмами та пошуку їх зв'язку з цукровим діабетом. З одержаних даних було встановлено, що пацієнти з гаплотипом СТ мають підвищений ризик цукрового діабету 2-го типу, а з гаплотипом АС, навпаки, ризик цієї недуги зменшується. Поряд із цим було вивчено поєднаний вплив поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток цукрового діабету 2-го типу за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності та створено класифікаційну модель. Це дозволило прогнозувати ризик розвитку діабету в загальній популяції, а також діагностувати його в необстежених пацієнтів. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність мала трикомпонентна модель, що включала поліморфні сайти rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* та індекс маси тіла. Було встановлено, що в осіб з ІМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> ризик виникнення діабету зростає в разі поєднання одного з варіантів генотипів К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона та носіями мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона досліджуваного гена.

Аналіз поєднаного впливу різних поліморфних сайтів гена *ENPP1* на розвиток діабету було виконане і в інших популяціях. Так, аналіз асоціації гаплотипів гена *ENPP1* із ЦД 2-го типу серед населення Південної Африки показав, достовірний зв'язок мінорного Т-алеля за поліморфізмом rs997509 з ЦД 2-го типу, також встановлено що в осіб із Т/Т-генотипом поширеність діабету на 7 % вище. Однак під час гаплотипного аналізу з rs1044498 виявилось, що гаплотип ТА має протективний ефект [164]. У праці Bochenski et al. Під час гаплотипного аналізу було встановлено, що в осіб з ожирінням носії мінорного алеля за двома зазначеними SNP мають у 4,2 раза вищий ризик виникнення діабету, ніж носії С-алеля. Böttcher зі своїми колегами в результаті генотипування дітей із Німеччини за генетичними варіантами

rs1044498, IVS20delT-11 та A/G $\leq$ 1044TGA гена *ENPP1* для вивчення їх асоціації з розвитком ожиріння виявили, що значно підвищений ризик ожиріння в дітей, що є носіями Q-алеля [205]. Поряд із цим під час проведення гаплотипного аналізу побачили, що для гаплотипу [Q-delT-G] було характерне порушення метаболізму глюкози, тоді як [K-delT-G] та [K-insT-A] були істотно пов'язані з поліпшенням чутливості до інсуліну та метаболізму глюкози, що підтверджує потенційну роль поліморфізму rs1044498 або похідних гаплотипів *ENPP1* у підвищеній сприйнятливості до ожиріння та раннього порушення толерантності до глюкози та інсулінорезистентності в дітей. Sahar Gohari-Lasaki у своїх дослідженнях асоціації поліморфних варіантів rs997509, rs1799774, rs1044498 та rs7754561 гена *ENPP1* з ускладненнями цукрового діабету 2-го типу, а саме діабетичною ретинопатією, показали, що серед чотирьох досліджених варіантів rs997509 та rs7754561 були істотно пов'язані з ускладненнями діабету за рецесивною ( $P = 0,01$ ) та домінантною ( $P = 0,01$ ) моделями успадкування відповідно [206]. Проводячи гаплотипний аналіз, автори встановили, що один гаплотип (T-A-T-A) достовірно пов'язаний із підвищеним ризиком діабетичних ускладнень ( $P = 0,04$ ). Також було показано, що носії алелей rs7754561 мали більш високий ризик артеріальної гіпертензії. Отже, поліморфні варіанти rs997509 та rs7754561 гена *ENPP1* асоціюються з підвищеним ризиком ретинопатії серед іранців із ЦД 2-го типу, а rs7754561 може бути потенційним генетичним маркером для прогнозу та діагностики діабетичної ретинопатії. На противагу вищепереліченим даним результати дослідження в Ірані Sharafshah et al. показали відсутність зв'язку гаплотипів гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу [207]. Також не виявлено впливу гаплотипів Q121, IVS20delT-11 та G+1044TGA гена *ENPP1* серед населення Англії [209]. На додаток: результати досліджень, проведені в Китайській популяції Хань, не показали асоціації різних гаплотипів гена з розвитком діабету [210].

Для того щоб пояснити одержаний у нашому дослідженні зв'язок поліморфізмів rs997509 та rs1044498 гена *ENPP1* із розвитком цукрового діабету 2-го типу, необхідно насамперед з'ясувати сутність цих нуклеотидних замін та їх можливий вплив на функціонування молекули білка, до структури гена якого вони входять.

Однонуклеотидний поліморфізм rs997509 розміщений у 3'-кінці 1-го інтрона гена *ENPP1* та являє собою заміну цитозину на тимін у 43822-му положенні гена, що однак не приводить до заміни амінокислоти поліпептидного ланцюга зрілого білка. Має доведений зв'язок із цілою низкою захворювань. Найчастіше цей поліморфізм асоціюється з виникненням інсулінорезистентності [158], ожирінням [156], зокрема й ожирінням у дітей [128] та цукровим діабетом 2-го типу [139].

Поліморфний сайт rs1044498 розміщений у 4-му екзоні гена *ENPP1* та призводить до заміни аденіну на цитозин у 43213-му положенні гена, що також призводить до заміни амінокислоти лізину на глютамін у 121-му положенні білка. За останні роки опублікована низка праць, в яких чітко продемонстрований вплив цього поліморфного локусу на розвиток інсулінорезистентності в європейській [134], азіатській популяціях [182] та серед китайських пацієнтів з ожирінням [80]. Показано, що носії мінорного Q-алеля за зазначеним поліморфізмом мають значно вищий ризик виникнення ЦД 2-го типу, порівняно з гомозиготами за основним С-алелем. Механізм, що є основою такого впливу, наразі не зовсім з'ясований. Можемо припустити, що заміна аденіну на цитозин, яка призводить до зміни кодуючого кодону AAG на CAG, спричиняє зміну послідовності амінокислот і структуру протеїну.

Молекула білка *ENPP1* взаємодіє з  $\alpha$ -субодиницею інсулінового рецептора, і за цієї генної мутації знижується тирозинкізна активність останнього, що зі свого боку призводить до порушення його аутофосфорилування і фосфорилування інших клітинних субстратів (IRS –

insulin receptor substrates). Як наслідок – припинення подальшого каскаду реакцій, необхідного рецептору інсуліна і для дії самого інсуліну, що призводить до інсулінорезистентності – один із патогенетичних механізмів виникнення цукрового діабету 2-го типу. Щоб зрозуміти молекулярний механізм інгібування інсулінового рецептора за допомогою молекули *ENPP1*, вчені з Університету Торонто одержали тривимірну реконструктивну інактивовану модель рецептора і порівнювали її з традиційною моделлю. Великий інтерес становив сполучний домен (CD) в  $\alpha$ -субодиниці, який включає залишки 485–599, де, швидше за все, і взаємодіє з *ENPP1*. CD є якості шарнірною ділянкою, що зв'язує ліганд-зв'язувальний домен із доменом  $\beta$ -субодиниці інсулінової тирозинкінази. Таким чином, коли інсулін зв'язується з  $\alpha$ -субодиницею, CD передає конформаційні зміни в PI, який активує  $\beta$ -субодиницю шляхом аутофосфорилування. Ця модель також пояснює, чому під час видалення цього домену (амінокислоти 485–599) утворюється рецептор, який усе ще зв'язується з інсуліном, але не піддається подальшому фосфорилуванню [107]. Також існує гіпотеза, яка підлягає перевірці, що існує негативний ефект *ENPP1* на  $\beta$ -клітини. Дані Otani et al. Свідчать про те, що резистентність  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса до інсуліну має шкідливий вплив як на її життєвий цикл, так і на здатність сприймати глюкозу [208]. Таким чином, можливо, що індукована *ENPP1* резистентність до інсуліну на рівні  $\beta$ -клітин може порушувати секрецію самого гормону, сприяючи тим самим розвитку ЦД 2-го типу.

Таким чином, ген *ENPP1*, мабуть, є унікальним геном із множинними та різноманітними ефектами на функцію рецептора інсуліну в різних тканинах, що модулюють інсулінорезистентність, ожиріння, цукровий діабет 2-го типу та діабетичні ускладнення.



## 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 T-алеля, ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу значно вищий, ніж у гомозигот за основним C-алелем ( $OR = 3,230$ ;  $P = 0,023$ ). Серед осіб із супутньою артеріальною гіпертензією, носіїв T-алеля за SNP rs997509, ризик розвитку цукрового діабету в 3,2 раза вищий (95 % CI = 1,223–8,746;  $P_{\text{спост}} = 0,018$ ), ніж у гомозигот за C-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  $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$  носійства мінорного T-алеля поліморфізму 1-го інтрона та одного з варіантів генотипів K/K, K/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона досліджуваного гена є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus / M. F. Kalinet et al. *Principles of Diabetes Mellitus*. Springer, Cham, 2017. P. 1–11 DOI: 10.1007/978-3-319-20797-1\_13-2.
2. Insulin translates unfavourable lifestyle into obesity / H. Kolb et al. *BMC Medicine*. 2018. Vol. 16. 232. DOI: 10.1186/s12916-018-1225-1.
3. Pathophysiology of Type 2 / J. Kesavadev et al. *The Diabetes Textbook*. Springer, Cham, 2019. P. 101–116 DOI: 10.1007/978-3-030-11815-0\_8.
4. Sun X., Yu W., Hu C. Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. 926713. DOI: 10.1155/2014/926713.
5. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of diabetes /S. E. Inzucchi et al. *Diabetes Care*. 2015. Vol. 38, Issue 1. P. 140–149. DOI: 10.2337/dc14-2441.
6. Guja C., Gagniuc P., Ionescu-Tîrgoviște C. Genetic factors involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *The Proceedings of the Romanian Academy, Series B*. 2012. Vol. 1. P. 44–61. URL: <https://academiaromana.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2012-1/06Guja.pdf>.
7. Type 2 diabetes mellitus: new genetic insights will lead to new therapeutics / M. G. M. Wolfset et al. *Current Genomics*. 2009. Vol. 10, No. 2. P. 110–118. DOI: 10.2174/138920209787847023.
8. Kommoju U. J., Reddy B. M. Genetic etiology of type 2 diabetes mellitus: a review. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2011. Vol. 31. P. 51–64. DOI: 10.1007/s13410-011-0020-8.
9. Ng T. W., Khan A. A., Meikle P. J. Investigating the pathogenesis and risk of Type 2 diabetes: clinical applications of metabolomics. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012. Vol. 7, Issue 6. P. 641–659. DOI: 10.2217/clp.12.75.

10. Effect of variable antidiabetic treatments strategy on oxidative stress markers in obese patients with T2DM / A. A. ALrefai et al. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2017. Vol. 9. 27. DOI: 10.1186/s13098-017-0220-6.
11. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective / Fr. Zaccardi et al. // *Postgraduate Medical Journal*. 2015. Vol. 92, Issue 1084. P. 63–69. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133281.
12. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine*. 2013. Vol. 7. P. 14–24.
13. Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes / L. S. Satin. *Molecular Aspects of Medicine*. 2015. Vol. 42. P. 61–77. DOI: 10.1016/j.mam.2015.01.003.
14. Zheng Y., Ley S. H., Hu Fr. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018. Vol. 14. P. 88–98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151.
15. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease / V. Ormazabal et al. *Cardiovascular Diabetology*. 2018. Vol. 17. 122. DOI: 10.1186/s12933-018-0762-4.
16. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World Journal Diabetes*. 2013. Vol. 4, Issue 4. P. 114–123. DOI: 10.4239/wjd.v4.i4.114.
17. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention / Y. Wu et al. *International Journal of Medical Sciences*. 2014. Vol. 11, Issue 11. P. 1185–1200. DOI: 10.7150/ijms.10001.
18. Al-Goblan A. S., Al-Alfi M. A., Khan M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metabolic Syndrome Obesity: Targets and Therapy*. 2014. Vol. 7. P. 587–591. DOI: 10.2147/DMSO.S67400.
19. Sharma R. B., Alonso L. C. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Current Diabetes Reports*. 2014. Vol. 14, Issue 6. 492. DOI: 10.1007/s11892-014-0492-2.

20. Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes / P. G. McTernan et al. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003. Vol. 88, Issue 12. P. 6098–6106. DOI: 10.1210/jc.2003-030898. PMID: 14671216.

21. Resistin does not down-regulate the transcription of insulin receptor promoter / X. Z. Qiao et al. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2008. Vol. 9, Issue 4. P. 313–318. DOI: 10.1631/jzus.B0710637.

22. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus / M. S. Burhans et al. *Comprehensive Physiology*. 2018. Vol. 9, Issue 1. P. 1–58. DOI: 10.1002/cphy.c170040.

23. Moraes-Vieira P. M., Saghatelian A., Kahn B. B. GLUT4 Expression in Adipocytes Regulates De Novo Lipogenesis and Levels of a Novel Class of Lipids With Antidiabetic and Anti-inflammatory Effects. *Diabetes Journals*. 2016. Vol. 65, Issue 7. P. 1808–1815. DOI: 10.2337/db16-0221.

24. Shah A., Mehta N., Reilly M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2008. Vol. 32, Issue 6. P. 638–644. DOI: 10.1177/0148607108325251.

25. Adipokines and insulin resistance / K. Rabe et al. *Molecular Medicine*. 2008. Vol.14, Issue 11-12. P. 741–751. DOI: 10.2119/2008-00058.Rabe.

26. Adipokines and Hepatic Insulin Resistance / Yu Li et al. *Journal of Diabetes Research*. 2013. Vol. 2013. 170532. DOI: 10.1155/2013/170532.

27. Stern J. H., Rutkowski J. M., Scherer P. E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metabolism*. 2016. Vol. 23, Issue 5. P. 770–784. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.04.011.

28. Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk / M. F. Landecho et al. *Nutrients*. 2019. Vol. 11. Issue 11. 2664. DOI: 10.3390/nu11112664.

29. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications / G. Paz-Filho et al. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2012. Vol. 56, No 9. P. 597–607. DOI: 10.1590/S0004-27302012000900001.

30. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 2008. Vol. 36, No. 3. P. 348–352 . DOI: 10.1042/BST036034.

31. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging* / S. Carter et al. 2013. Vol. 8. P. 829–844. DOI: 10.2147/CIA.S36367.

32. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity / M. A. Exley et al. *The Journal of endocrinology*. 2014. Vol. 223, Issue 2. P. 41–48. DOI: 10.1530/JOE-13-0516.

33. Kwon H., Pessin J. E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in endocrinology*. 2013. Vol. 4. 71. DOI: 10.3389/fendo.2013.00071.

34. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population / J. L. Anderson et al . *The American Journal of Cardiol*. 2010. Vol. 106, Issue 70. P. 963–968. DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.05.027.

35. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis / A. G. Pittas et al. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007. Vol. 92. Issue 6. P. 2017–2029. DOI: 10.1210/jc.2007-0298.

36. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography / S. Pilz et ai. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008. Vol. 93. Issue 10. P. 3927–3935. DOI: 10.1210/jc.2008-0784.

37. Vitamin D and diabetes let the sunshine in / S. Penckofer et al. *The Diabetes educator*. 2008. Vol. 34, Issue. 6. P. 939–940. DOI: 10.1177/0145721708326764.

38. Vitamin D and diabetes / T. Takiishi et al. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010. Vol. 39, Issue 2. P. 419–446. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.02.013.

39. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006. Vol. 92, Issue 1. P. 39–48. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.001.

40. Akalin A., Karakus A., Urfali F. The relationship between 25(OH)2D3 levels and markers of atherosclerosis and inflammation in type 2 diabetic patients. *Endocrine Abstracts*. 2012. Vol. 29 : Joint 15th International Congress of Endocrinology (ICE) and 14th European Congress of Endocrinology (ECE), Florence, Itali, May 05-09, 2012. P. 317. URL: <https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0029/ea0029p317>.

41. Vitamin D serum levels and cardiovascular risk factors in postmenopausal women / A. Bohdanowicz-Pawlak et al. *Endocrine Abstracts*. 2012. Vol. 29 : Joint 15th International Congress of Endocrinology (ICE) and 14th European Congress of Endocrinology (ECE), Florence, Itali, May 05-09, 2012. P. 331. URL: <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0029/ea0029p331.htm>

42. Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations / S. D. Ress et al. *Diabetologia*. 2011. Vol. 54, No. 6. P. 1368–1374 DOI: 10.1007/s00125-011-2063-2.

43. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPAR $\gamma$ 2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk / D. K. Sanghera et al. *BMC Medical Genetics*. 2008. Vol. 9. P. 59. DOI: 10.1186/1471-2350-9-59.

44. Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in Sikhs of Punjabi origin from India / R. Saxena et al. *Diabetes*. 2013. Vol. 62, Issue. 5. P. 1746–1755. DOI: 10.2337/db12-1077.

45. Type 2 diabetes risk alleles near BCAR1 and in ANK1 associate with decreased  $\beta$ -cell function whereas risk alleles near ANKRD55 and GRB14 associate with decreased insulin sensitivity in the Danish Inter99 cohort / M. N. Harder et al. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013. Vol. 98, Issue 4. P. 801–806. DOI: 10.1210/jc.2012-4169.

46. Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes / S. D. Rees et al. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, Issue 9. e24710. DOI: 10.1371/journal.pone.0024710.

47. Rich S. S. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes*. 1990. Vol. 39, No 11. P. 1315–1319. DOI: 10.2337/diab.39.11.1315.

48. Meigs J. B., Cupples L. A., Wilson P. W. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2000. Vol. 49, Issue 12. P. 2201–2217. DOI: 10.2337/diabetes.49.12.2201.

49. Concordance for Type 1 (insulin-dependent) and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland / J. Kaprio et al. *Diabetologia*. 1992. Vol. 35, Issue 11. P. 1060–1067. DOI: 10.1007/BF02221682.

50. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis / W. C. Knowler et al. *Diabetes metabolism reviews*. 1990. Vol. 6, Issue 1. P. 1–27. DOI: 10.1002/dmr.5610060101.

51. Susceptibility genes for insulin resistance and type 2 diabetes / F. Grigorescu et al. *Genetics of diabetes. The Truth Unveiled* / ed. by. D. Cheta. București : Editura Academiei Române ; Basel : S. Karger AG, 2010. P. 131–192.



52. McCarthy M. I. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *The New England journal of medicine*. 2010. Vol. 363. P. 2339–2350. DOI: 10.1056/NEJMra0906948.

53. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes / K. J. Gaulton et al. *Diabetes*. 2008. Vol. 57, Issue 11. P. 3136–3144. DOI:10.2337/db07-1731.

54. Guja C., Gagniuc P., Ionescu-Tîrgoviște C. Genetic factors involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Proceedings of the romanian academy. Series B : Chemistry, Life Sciences and Geoscience*. 2012. № 1. P 44–61. URL: <https://acad.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2012-1/06Guja.pdf>

55. Майоров А. Ю. Инсулинорезистентность в патогенезе сахарного диабета 2 типа. Вопросы патогенеза. *Сахарный диабет*. 2011. № 1. С. 35–43.

56. Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки / О. М. Селиванова и др. *Успехи биологической химии*. 2018. Т. 58. С. 313–346.

57. Нарушения углеводного обмена и инсулинорезистентность при ожирении у детей / Т. Е. Таранушенко и др. *Эндокринология*. 2017. Спецвыпуск. С. 37–45.

58. Патогенез инсулинорезистентности при метаболическом ожирении / Л. С. Литвинова и др. *Биомедицинская химия*. 2015. Т. 61, Вып. 1. С. 70–82. DOI: 10.18097/PBMC20156101070.

59. Kim J., Wei Y., Sowers J. R. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*. 2008. Vol. 102, Issue 4. P. 401–414. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165472.

60. Перспективные фармакологические мишени для лечения заболеваний, сопряженных с дефектом сигнального пути рецептора инсулина / Е. А. Горбунов и др. *Проблемы эндокринологии*. 2015. № 6. С. 44–54.

61. Insulin resistance in type 2 diabetes youth relates to serum free fatty acids and muscle mitochondrial dysfunction / M. Cree-Green et al. *Diabetes*

*Complications*. 2017. Vol. 31, Issue 1. P. 141–148. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.10.014.

62. Дедов И. И., Шестакова М. В. Сахарный диабет : диагностика, лечение, профилактика. Москва : Медицинское информационное агентство, 2011. 808 с.

63. Демидова Т. Ю. Этиопатогенетическая роль инсулинорезистентности в развитии метаболических и сосудистых нарушений при сахарном диабете типа 2. *Фарматека*. 2010. № 16. С. 18–24.

64. Шагалова Н. Я. Инсулинорезистентность – польза или вред? *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 2. С. 89.

65. Stefan C., Jansen S., Bollen M. Modulation of purinergic signaling by NNP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic signalling*. 2006. Vol. 2. P. 361–370. DOI: 10.1007/s11302-005-5303-4.

66. Johnson K., Terkeltaub R. Inorganic pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of articular cartilage. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2005. Vol. 10. P. 988–997. DOI: 10.2741/1593.

67. 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 et al. *Endocrine Reviews*. 2008. Vol. 29, Issue 1. P. 62–75. DOI: 10.1210/er.2007-0004.

68. Stefan C., Jansen S., Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in Biochemical Sciences*. 2005. Vol. 30, Issue 10. P. 542–550. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.08.005.

69. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6 / Y. Nitschke et al. *The American Journal of Human Genetics*. 2012. Vol. 90, Issue 1. P. 25–39. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.020.

70. Differential detergent resistance of the apical and basolateral NPPases: relationship with polarized targeting / J. L. Delaunay et al. *Journal of cell science*. 2007. Vol. 120. P. 1009–1016. DOI: 10.1242/jcs.002717.

71. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2000. Vol. 362. P. 299–309. DOI: 10.1007/s002100000309.

72. Gijsbers R., Ceulemans H., Bollen M. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. *Biochemical Journal*. 2003. Vol. 371. P. 321–330. DOI: 10.1042/bj20021943.

73. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases on the move / M. Bollen et al. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2000. Vol. 35, Issue 6. P. 393–432. DOI: 10.1080/10409230091169249.

74. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family / H. Sakagami et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, Issue 24. P. 23084–23093. DOI: 10.1074/jbc.M413438200.

75. Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signalling*. 2012. Vol. 8. P. 437–502. DOI: 10.1007/s11302-012-9309-4.

76. 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 et al. *Endocrine Reviews*. 2008. Vol. 29, Issue 1. P. 62–75. DOI: 10.1210/er.2007-0004.

77. Picher M., Burch L. H., Boucher R. C. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways – implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, Issue 19. P. 20234–20241. DOI: 10.1074/jbc.M400305200.

78. Chen G., Deng C., Li Y-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone Research*. 2016. 16009. DOI: 10.1038/boneres.2016.9.

79. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis / L. E. Zweifler et al. *International Journal of Oral Science*. 2015. Vol. 7. P. 27–41. DOI: 0.1038/ijos.2014.62.

80. 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 et al. *The Review of Diabetic Studies*. 2006. Vol. 3, Issue 1. P. 21–30. DOI: 10.1900/RDS.2006.3.21.

81. Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets / B. Lorenz-Depiereux et al. *The American Journal of Human Genetics*. – 2010. Vol. 86, Issue 2. P. 273–278. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.01.006.

82. The Mutational Spectrum of ENPP1 as Arising After the Analysis of 23 Unrelated Patients with Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) / N. Ruf et al. *Mutation in Brief*. 2005. Vol. 25, Issue 1. P. 98–98. DOI: 10.1002/humu.9297.

83. Glucocorticoid hormones increase the activity of plasma membrane alkaline phosphodiesterase I in rat hepatoma cells / G. G. Rousseau et al. *PNAS*. 1980. Vol. 77, № 2. P. 1005–1009. DOI: 10.1073/pnas.77.2.1005.

84. 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 et al. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996. Vol. 11, Issue 2. P. 183–192. DOI: 10.1002/jbmr.5650110207.

85. 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 et al. *Biochemical Journal*. 1995. Vol. 306, Issue 1. P. 271–277. DOI: 10.1042/bj3060271.

86. Interleukin 1  $\beta$  suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC1 in human chondrocytes / M. Lotz et al. *PNAS*. 1995. Vol. 92. P. 10364–10368. DOI: 10.1073/pnas.92.22.10364.

87. Abhishek A., Doherty M. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis – role of ANKH. *Nature reviews. Rheumatology*. 2011. Vol. 7. P. 96–104. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.182.

88. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity / H. N. Lyon et al. *Diabetes*. 2006. Vol. 55. P. 3180–3184. DOI: <https://doi.org/10.2337/db06-0407>.

89. 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 et al. *Diabetes*. 2008. Vol. 57. P. 1971–1977. DOI: 10.2337/db08-0266.

90. Onyedibe K. I, Wang M., Sintim H. O. ENPP1, an Old Enzyme with New Functions, and Small Molecule Inhibitors-A STING in the Tale of ENPP1. *Molecules*. 2019, Vol. 24, Issue 22. 4192. DOI: 10.3390/molecules24224192.

91. Goding J. W, Grobden B., Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2003. Vol. 1638, Issue 1. P. 1–19. DOI: 10.1016/S0925-4439(03)00058-9.

92. Molecular cloning of cDNAs for human fibroblast nucleotide pyrophosphatase / Funakoshi I. et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992. Vol. 295, Issue 1, P. 180–187. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90504-P.

93. Takahashi T., Old L. J., Boyse E. A. Surface alloantigens of plasma cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1970. Vol. 131. P. 1325–1341. DOI: 10.1084/jem.131.6.1325.

94. Belli S. I., Goding J. W. Biochemical Characterization of human PC-1, an enzyme possessing alkaline phosphodiesterase I and nucleotide pyrophosphatase activities. *European Journal of Biochemistry*. 1994. Vol. 226, Issue 2. P. 433–443. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb20068.x.

95. Crystal structure of ENPP1, an extracellular glycoprotein involved in bonemineralisation and insulin signaling / K. Kato et al. *PNAS*. 2012. Vol. 109, No 42. P. 16876–16881. DOI: 10.1073/pnas.1208017109.

96. The Mutational Spectrum of ENPP1 as Arising After the Analysis of 23 Unrelated Patients with Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) / N. Ruf et al. *Mutation in Brief*. 2005. Vol. 768. P. 1–7. DOI: 10.1002/humu.9380.

97. 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 et al. *Endocrine Reviews*. 2008. Vol. 29, Issue 1. P. 62–75. DOI: 10.1210/er.2007-0004.

98. Regulation of purified hepatic PC-1 (phosphodiesterase-I/nucleotide pyrophosphatase) by threonine auto(de)phosphorylation and by binding of acidic fibroblast growth factor / M. Yuriarte et al. *Biochemical Journal*. 1995. Vol. 306, Issue 1. P. 271–277. DOI: 10.1042/bj3060271.

99. 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 et al. *The Review of Diabetic Studies*. 2006. Vol. 3, Issue 1. P. 21–30. DOI: 10.1900/RDS.2006.3.21.

100. Hofmann Bowman M. A, McNally E. M. Genetic pathways of vascular calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine*. Vol. 22, Issue 4. P. 93–98. DOI: 10.1016/j.tcm.2012.07.002.

101. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus / B. A. Maddux et al. *Nature*. 1995. Vol. 373. P. 448–451. DOI: 10.1038/373448a0.

102. Role of somatomedin-B-like domains on ENPP1 inhibition of insulin signaling / C. Dimatteo et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013. Vol. 1833, Issue 3. P. 552–558. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.10.017.

103. Increased adipose tissue PC-1 protein content, but not tumournecrosis factor-alpha gene expression, is associated with a reduction of both whole body insulin sensitivity and insulin receptor tyrosine-kinase activity / L. Frittitta et al. *Diabetologia*. 1997. Vol. 40. P. 282–289. DOI: 10.1007/s001250050675.

104. PC-1 content in skeletal muscle of non-obese, non-diabetic subjects: relationship to insulin receptor tyrosine kinase and whole body insulin sensitivity / L. Frittitta et al. *Diabetologia*. 1996. Vol. 39. P. 1190–1195. DOI: 10.1007/BF02658505.

105. Kumakura S., Maddux B. A., Sung C. K. Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 can influence insulin action at a post-receptor site. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998. Vol. 68. P. 366–377. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19980301)68:3<366::AID-CB7>3.0.CO;2-S.

106. Skeletal muscle content of membrane glycoprotein PC-1 in obesity. Relationship to muscle glucose transport / J. F. Youngren et al. *Diabetes*. 1996. Vol. 45, Issue10. P. 1324–1328. DOI: 10.2337/diab.45.10.1324.

107. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance / I. D. Goldfine et al. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998. Vol. 182. P. 177–184. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9609127/>.

108. Role of PC-1 in the etiology of insulin resistance. I. D. Goldfine et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 892, Issue 1. P. 204–222. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07797.x.

109. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia / B. A. Maddux et al. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2006. Vol. 290, Issue 4. P. E746–E749. DOI: 10.1152/ajpendo.00298.2005.

110. Basic V., Stubbs R. S., Hayes M. T. Liver ENPP1 protein increases with remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *BMC Gastroenterology*. 2014. Vol. 14. 9000. DOI: 10.1186/s12876-014-0222-x.

111. Production of inhibitor of insulinreceptor tyrosine kinase in fibroblasts from patient with insulin resistance and NIDDM / P. Sbraccia et al. *Diabetes*. 1991. Vol. 40. P. 295–299. DOI: 10.2337/diab.40.2.295.

112. Role of GALNT2 in the modulation of ENPP1 expression, and insulin signaling and action: GALNT2: A novel modulator of insulin signaling / A. Marucci et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013. Vol. 1833, Issue 6. P. 1388–1395. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.032.

113. Abate N., Ciociola E., Chandalia M. Effects of Enpp1 overexpression on adipocyte maturation. *67th Annual Meeting of the American-Diabetes-Association, Chicago, 2007*. Vol. 56. URL: [https://www.researchgate.net/publication/295233315\\_Effects\\_of\\_ENPP1\\_over-expression\\_on\\_adipocyte\\_maturation](https://www.researchgate.net/publication/295233315_Effects_of_ENPP1_over-expression_on_adipocyte_maturation).

114. Increased activity of membrane glycoprotein PC-1 in the fibroblasts from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients with insulin resistance / S. Teno et al. *Diabetes research and clinical practice*. 1999. Vol. 45. P. 25–30. DOI: 10.1016/s0168-8227(99)00056-x.

115. Pan W., Chandalia M., Abate N. New Insights into the Role of ENPP1 in Insulin Resistance. *Journal of metabonomics & metabolites*. 2012. Vol. 1, Issue 1. DOI: 10.4172/2325-9736.1000e103.

116. Inhibition of insulin receptor phosphorylation by PC-1 is not mediated by the hydrolysis of adenosine triphosphate or the generation of



adenosine / A. Grupe et al. *Journal of biological chemistry*. 1995. Vol. 270, Issue 38. P. 22085–22088. DOI: 10.1074/jbc.270.38.22085.

117. Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 in MDA-MB231 breast cancer cells is associated with inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity / A. Belfiore et al. *Molecular endocrinology*. 1996. Vol. 10, Issue 11. P. 1318–1326. DOI: 10.1210/mend.10.11.8923458.

118. The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121) / B. V. Costanzo et al. *Diabetes*. 2001. Vol. 50, Issue 4. P. 831–836. DOI: 10.2337/diabetes.50.4.831.

119. Yip C. C., Ottensmeyer P. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278. P. 27329–27332. DOI: 10.1074/jbc.R300021200.

120. Maddux B. A, Goldfine I. D. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor  $\alpha$ -subunit. *Diabetes*. 2000. Vol. 49, Issue 1. P. 13–19. DOI: 10.2337/diabetes.49.1.13.

121. White M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. American journal of physiology. *Endocrinology and metabolism*. 2002. Vol. 283. P. E413–E422. DOI: 10.1152/ajpendo.00514.2001.

122. Interaction of the protein tyrosine phosphatase PTPL1 with the PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-binding adaptor protein TAPP1 / W. A. Kimber et al. *Biochemical journal*. 2003. Vol. 376. P. 525–535. DOI: 10.1042/BJ20031154.

123. Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles / R. A. Heller-Harrison et al. *Journal of biological chemistry*. 1996. Vol. 271, Issue 17. P. 10200–10204. DOI: 10.1074/jbc.271.17.10200.

124. Barzilai N., Rossetti L. Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *Journal of biological chemistry*. 1993. Vol. 268. P. 25019–25025.

125. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution / R. L. Printz et al. *Journal of biological chemistry*. 1993. Vol. 268. P. 5209–5219.

126. Cohen P., Frame S. The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001. Vol. 2. P. 769–776. DOI: 10.1038/35096075.

127. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex / R. . Harris et al. *Advances in enzyme regulation*. 2002. Vol. 42. P. 249–259. DOI: 10.1016/s0065-2571(01)00061-9.

128. The role of K121Q ENPP1 polymorphism in diabetes mellitus and its complications / C. B. Leitão et al. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008. Vol. 41, No 3. P. 229–234. DOI: 10.1590/S0100-879X2006005000202.

129. Di J. Y., Dai M. L., Zhang Z. X. ENPP1 K121Q (rs1044498C>A) genetic polymorphism confers a high risk of susceptibility to coronary heart disease: A PRISMA-compliant article. *Medicine*. 2018. Vol. 97, Issue 27. e11236. DOI: 10.1097/MD.00000000000011236.

130. ENPP1 K121Q functional variant enhances susceptibility to insulin resistance and dyslipidemia with metabolic syndrome in Asian Indians / G. K. Bhatti et al. *International Journal of Diabetes & Metabolism*. 2018. Vol. 24, No. 1–4. P. 8–15. DOI: 10.1159/000492478.

131. The K121Q polymorphism of the ENPP1/PC-1 gene is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction / S. Bacci et al. *Diabetes*. 2005. Vol. 54, Issue. 10. P. 3021–3025. DOI: 10.2337/diabetes.54.10.3021.

132. ENPP1/PC-1 Gene K121Q Polymorphism Is Associated with Obesity in European Adult Populations: Evidence from A Meta-Analysis Involving 24, 324 Subjects / R. Wang et al. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2011. Vol. 24, Issue 2. P. 200–206. DOI: 967/0895-3988.2011.02.015.

133. The Q121 variant of ENPP1 may protect from childhood overweight/obesity in the Italian population / A. Morandi et al. *Obesity*. 2009. Vol. 17, Issue 1. P. 202–206. DOI: 10.1038/oby.2008.470.

134. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with type 2 diabetes and obesity in the Moroccan population / El. Y. Achhab et al. *Diabetes & Metabolism*. 2009. Vol. 35, Issue 1. P. 37–42. DOI: 10.1016/j.diabet.2008.06.005.

135. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in different populations: evidence based on 40 studies / S. T. Tang et al. *Endocrine Journal*. 2014. Vol. 61, Issue 11. P.1093–1103. DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0272.

136. Association of genetic variation in ENPP1 with obesity-related phenotypes / C. P. Jenkinson et al. *Obesity*. 2008. Vol. 16, Issue 7. P. 1708–1713. DOI: 10.1038/oby.2008.262.

137. The role of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 in diabetic nephropathy / D. A. Sortica et al. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2011. Vol. 55, No 9. P. 677–685. DOI: 10.1590/S0004-7302011000900002.

138. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults / N. Matsuoka et al. *International Journal of Obesity*. 2006. Vol. 30. P. 233–237. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803132.

139. ENPP1 121Q functional variant enhances susceptibility to coronary artery disease in South Indian patients with type 2 diabetes mellitus / S. Sumi et al. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017. Vol. 435. P. 67–72. DOI: 10.1007/s11010-017-3057-2.

140. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals / J. Bochenski et al. *Diabetes*. 2006. Vol. 55, Issue 9. P. 2626–2630. DOI: 10.2337/db06-0191.

141. Марченко И. В., Дубовик Е. И., Ткач Г. Ф. Ассоциация rs997509-полиморфизма гена ENPP1 с развитием сахарного диабета 2-го типа в

української популяції. *Wiadomości Lekarskie*. 2018. Т. 71, № 3, ч. 1. С. 490–495. URL: <https://cutt.ly/wjF0cwR>.

142. Марченко І. В., Дубовик Е. І., Матлай О. І. Аналіз асоціації K121Q-поліморфізму гена ENPP1 з факторами ризику розвитку сахарного діабету 2-го типу в українській популяції. *Wiadomości Lekarskie*. 2018. Т. 71, № 4. С. 815–820. URL: <https://cutt.ly/LjKqcXx>.

143. Марченко І. В. Аналіз поєднаного 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](https://ujcem.med.sumdu.edu.ua/images/sampleddata/2018/2/278284_2018-27.pdf).

144. 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](https://ujcem.med.sumdu.edu.ua/images/sampleddata/2018/1/20_2018-12.pdf).

145. 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.

146. 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.

147. 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.

148. Rask-Madsen C., King G. L. Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 17, No. 1. P. 20-33. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.11.012.

149. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*. 2010. Vol. 1, Issue 3. P. 68–75. DOI: 10.4239/wjd.v1.i3.68.

150. Yki-Järvinen H. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes / ed. by: J. A. H. Wass et al. 2nd edition. Oxford : Oxford University Press, 2011. DOI: 10.1093/med/9780199235292.003.1336.

151. 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 et al. *Diabetes*. 2000. Vol. 49, Issue 9. P. 1608–1611. DOI: 10.2337/diabetes.49.9.1608.

152. Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved in  $\beta$ -Cell Function as Well as Insulin Action / I. Barroso et al. *PLOS Biology*. 2003. Vol.1, Issue 3. e. 92. DOI: 10.1371/journal.pbio.0000020.

153. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes / D. Meyre et al. *Nature Genetics*. 2005. Vol. 37, No 8. P. 863–867. DOI: 10.1038/ng1604.

154. Зв'язок K121Q поліморфізму гена ENPP1 з гострим коронарним синдромом в осіб з нормальним та підвищеним артеріальним тиском / І. О. Розуменко та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. Вип. 4. Т. 3, № 115. С. 66–70. URL: <https://cutt.ly/GjMP2YX>.

155. The Q121 Variant of ENPP1 May Protect From Childhood Overweight/obesity in the Italian Population / A. Morandi et al. *Obesity*. 2009. Vol. 17, Issue 1. P. 202–206. DOI: 10.1038/oby.2008.470.

156. Association of the ENPP1 rs997509 polymorphism with obesity in South African mixed ancestry learners / T. Matsha et al. *East African Medical Journal*. 2010. Vol. 87, No. 8. P. 323–329. URL: <https://www.ajol.info/index.php/eamj/article/view/75973>.

157. The ENPP1 K121Q Polymorphism Is Associated With Type 2 Diabetes in European Populations / J. B. McAteer et al. *Diabetes*. 2008. Vol. 57, No 4. P. 1125–1130. DOI: 10.2337/db07-1336.

158. New Polymorphism of ENPP1 (PC-1) Is Associated With Increased Risk of Type 2 Diabetes Among Obese Individuals / J. Bochenski et al. *Diabetes*. 2006. Vol. 55, No 9. P. 2626–2630. DOI: 10.2337/db06-0191.

159. Role of the ENPP1 K121Q Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes in North Indian Punjabi Population / Badaruddoza et al. *Journal of Diabetes and Metabolism*. 2014. Vol. 5, Issue 10. 1000450. DOI: 10.4172/2155-6156.1000450.

160. ENPP1/PC-1 K121Q Polymorphism and Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes / N. Abate et al. *Diabetes*. 2005. Vol. 54, No.4. P. 1207–1213. DOI: 10.2337/diabetes.54.4.1207.

161. The PC-1 Q121 Allele Is Exceptionally Prevalent in the Dominican Republic and Is Associated with Type 2 Diabetes / K. Hamaguchi et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004. Vol. 89. Issue 3, Part. 1. P. 1359–1364. DOI: 10.1210/jc.2003-031387.

162. ENPP1 K121Q polymorphism and obesity, hyperglycaemia and type 2 diabetes in the prospective DESIR Study / D. Meyre et al. *Diabetologia*. 2007. Vol. 50. P. 2090–2096. DOI: 10.1007/s00125-007-0787-9.

163. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in different populations: evidence based on 40 studies / S. T. Tang et al. *Endocrine Journal*. 2014. Vol. 61, Issue 11. P. 1093–1103. DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0272.

164. Contribution of ENPP1, TCF7L2, and FTO polymorphisms to type 2 diabetes in mixed ancestry ethnic population of South Africa / Y. Y. Yako et al. *African Health Sciences*. 2015. Vol. 15, Issue 4. P. 1149–1160. DOI: 10.4314/ahs.v15i4.14.

165. Effect of the rs997509 Polymorphism on the Association between Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1 and Metabolic Syndrome and Impaired Glucose Tolerance in Childhood Obesity / N. Santoro et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009. Vol. 94, Issue 1. P. 300–305. DOI: 10.1210/jc.2008-1659.

166. A Polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance / A. Pizzuti et al. *Diabetes*. 1999. Vol. 48, Issue 9. P. 1881–1884. DOI: 10.2337/diabetes.48.9.1881.

167. Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis / H. F. Gu et al. *Diabetes*. 2000. Vol. 49, Issue 9. P. 1601–1603. DOI: 10.2337/diabetes.49.9.1601.

168. The K121Q Polymorphism of the PC-1 Gene Is Associated With Insulin Resistance but not With Dyslipidemia / A Kubaszek et al. *Diabetes Care*. 2003. Vol. 26, Issue 2. P. 464–467. DOI: 10.2337/diacare.26.2.464.

169. Type 2 diabetes in a central Indian population: association with PPARG2 P121A allele but not ENPP1 K121Q / A. K. Tripathi et al. *Advances in Genomics and Genetics*. 2013. Vol. 3. P. 1–9. DOI 10.2147/AGG.S42936.

170. PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism in overweight and obese type 2 diabetic coronary heart disease patients / G. Lazarevic et al. *Acta Cardiologica*. 2008. Vol. 63, Issue 3. P. 323–330. DOI: 10.2143/AC.63.3.1020308.

171. Dabisch-Ruthe M. Charakterisierung des pyrophosphatmetabolismus bei pseudoxanthoma elasticum. : Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Universität Bielefeld, 2014. 96 p. URL: [https://pub.uni-bielefeld.de/download/2676372/2676373/Doktorarbeit\\_Dabisch-Ruthe\\_Bibliothek.pdf](https://pub.uni-bielefeld.de/download/2676372/2676373/Doktorarbeit_Dabisch-Ruthe_Bibliothek.pdf).

172. Autosomal-Recessive Hypophosphatemic Rickets Is Associated with an Inactivation Mutation in the ENPP1 Gene / Levy-Litan V. et al. *The American Journal of Human Genetics*. 2010. Vol. 86, Issue 2. P. 273–278. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.01.010.

173. Impact of ENPP1 and MMP3 gene polymorphisms on aortic calcification in patients with type 2 diabetes in a Korean population / J. E. Lee et al. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010. Vol. 88, Issue 1, P. 87–96. DOI: 10.1016/j.diabres.2010.01.002.

174. Shaker O. G., Ismail M. F. Association of Genetic Variants of MTHFR, ENPP1, and ADIPOQ with Myocardial Infarction in Egyptian Patients. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014. Vol. 69, Issue 2. P. 265–274. DOI: 10.1007/s12013-013-9794-2.

175. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus / S. Lehto et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1996. Vol. 16, Issue 8. P. 978–983. DOI: 10.1161/01.atv.16.8.978.

176. K121Q Polymorphism of the ENPP1 Gene is Related to Acute Coronary Syndrome in Ukrainian Patients with Normal but not Enhanced Body Mass Index / I. A. Rozumenko et al. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 2014. Vol.14, No 4. P. 271–176. DOI: 10.3844/ojbsci.2014.271.276.

177. National Diabetes Statistics Report, 2020 : Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*. URL: <https://cutt.ly/aj4TP4h>.

178. Changes in Incidence of Diabetes in U.S. Adults, 1997–2003/ L. S. Geiss et al. *American Journal of Preventive Medicine*. 2006 Vol. 30, Issue 5. P. 371–377. DOI: 10.1016/J.AMEPRE.2005.12.009.

179. Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996–2005 / E. L Massó González<sup>1</sup> et al. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 2009. Vol. 63. P. 332–336. DOI: 10.1136/jech.2008.080382.



180. Design and cohort description of the InterAct Project: an examination of the interaction of genetic and lifestyle factors on the incidence of type 2 diabetes in the EPIC Study / C. Langenberg et al ; The InterAct Consortium. *Diabetologia*. 2011. Vol. 54, Issue 9. P. 2272–2282. DOI: 10.1007/s00125-011-2182-9.

181. Genetic Variants of the ENPP1/PC-1 Gene Are Associated With Hypertriglyceridemia in Male Subjects / S. Tanyolac et al. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2009. Vol. 7, Issue 6. P. 543–548. DOI: 10.1089/met.2009.0027.

182. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults / N. Matsuoka et al. *International Journal of Obesity*. 2006. Vol. 30. P. 233–237. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803132.

183. The PC-1 Q121 Allele Is Exceptionally Prevalent in the Dominican Republic and Is Associated with Type 2 Diabetes / K. Hamaguchi et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004. Vol. 89, Issue 3. P. 1359–364. DOI: 10.1210/jc.2003-031387.

184. 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 et al. *Diabetes*. 2000. Vol. 49, Issue 9. P. 1608–1611. DOI: 10.2337/diabetes.49.9.1608.

185. K121Q PC-1 Gene Polymorphism Is Not Associated with Insulin Resistance in a Spanish Population / J. L. González-Sánchez et al. *Obesity Research*. 2003. Vol. 11, Issue 5. P. 603–605. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1038/oby.2003.86>.

186. Ethnicity, Obesity, and Risk of Type 2 Diabetes in Women: A 20-year follow-up study / I. Shai et al. *Diabetes Care*. 2006. Vol.29, № 7. P. 1585–1590. DOI: 10.2337/dc06-0057.

187. Active Smoking and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis / C. Willi et al. *JAMA*. 2007. Vol. 298, № 22. P. 2654–2664. DOI: 10.1001/jama.298.22.2654.

188. Smoking, Smoking Cessation, and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus. A Cohort Study / H. C. Yeh et al. 2010. Vol. 152, Issue 1. P. 10–17. DOI: 10.7326/0003-4819-152-1-201001050-00005.

189. Association Between Passive and Active Smoking and Incident Type 2 Diabetes in Women / L. Zhang et al. *Diabetes Care*. 2011. Vol. 34, Issue 4. P. 892–897. DOI: 10.2337/dc10-2087.

190. Obesity and ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) polymorphism and their association with pathophysiology diabetes type 2 in Central Indian population / A. K. Tripathi et al. *Journal of Diabetes and Endocrinology*. 2013. Vol. 4, Issue 2. P. 19–26. DOI: 10.5897/JDE12.0059.

191. Nicotine infusion acutely impairs insulin sensitivity in type 2 diabetic patients but not in healthy subjects / T. Axelsson et al. *Journal of Internal Medicine*. 2001. Vol. 249. P. 539–544. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2001.00840.x.

192. Pathophysiological Effects of Nicotine on the Pancreas: An Update / P. Chowdhury et al. *Experimental Biology and Medicine*. 2002. Vol. 227, Issue 7. P. 445–454. DOI: 10.1177/153537020222700708.

193. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: results from a long-term prospective study / A. Gambineri et al. *Diabetes*. 2012. Vol. 61, Issue. 9. P. 2369–2374. DOI: 10.2337/db11-1360.

194. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis / X. H. Li et al. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016. Vol. 103, Issue 3. P. 818–829. DOI: 10.3945/ajcn.115.114389.

195. Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis / E. Agardh et al. *International Journal of Epidemiology*. 2011. Vol. 40, Issue 3. P. 804–818. DOI: 10.1093/ije/dyr029 DOI: 10.1093/ije/dyr029.

196. Leisure time physical activity and the risk of type 2 diabetes in men and women from the general population. The MONICA/KORA Augsburg Cohort

Study / C. Meisinger et al. *Diabetologia*. 2005. Vol. 48, Issue1. P. 27–34. DOI: 10.1007/s00125-004-1604-3.

197. Manman Han. The Dose-Response Relationship between Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes among Asian Men: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Journal of Diabetes Research*. 2020. 1032049. DOI. 10.1155/2020/1032049.

198. Патогенетичні механізми гіпертонічної хвороби на тлі цукрового діабету 2-го типу / С. М. Коваль та ін. *Український медичний альманах*. 2011. Т. 14, № 4. С. 61-65. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Uma\\_2011\\_4\\_20](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Uma_2011_4_20).

199. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. 1998. Vol. 352, Issue 9131. P. 837–853. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6).

200. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism is not associated with type 2 diabetes in a Chinese population / D. Zhou et al. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2012. Vol. 13, Issue 3. P. 372–378. DOI: 10.1177/1470320311435535.

201. No Association of TCF7L2 and ENPP1 Gene Polymorphisms in Malaysian Type 2 Diabetes Mellitus with or without Hypertension / P. Vasudevan et al. *Research Journal of Biological Sciences*. 2009. Vol. 4, Issue 6. P. 703–709. URL: <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjbsci/2009/703-709.pdf>.

202. The K121Q Polymorphism of the ENPP1/PC-1 Gene Is Associated With Insulin Resistance/Atherogenic Phenotypes, Including Earlier Onset of Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction / S. Bacci et al. *Diabetes*. Vol. 54. P. 3021–3025. URL: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/diabetes/54/10/3021.full.pdf>.

203. Taher Q. M., Ridha M. M. The ENPP1 K121Q Polymorphism Protective Impact Against Hypertension In Iraqi Type 2 Diabetic Patients 2016. Vol. 4, Issue 7. P. 45–56. URL: <http://oaji.net/articles/2016/491-1469008540.pdf>.

204. 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 et al. *Diabetes*. 2008. Vol. 57, Issue 7. P. 1971–1977. DOI: 10.2337/DB08-0266.

205. ENPP1 Variants and Haplotypes Predispose to Early Onset Obesity and Impaired Glucose and Insulin Metabolism in German Obese Children / Y. Böttcher et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 91, Issue 12. P. 4948–4952. DOI: 10.1210/jc.2006-0540.

206. Single locus and haplotype association of ENPP1 gene variants with the development of retinopathy among type 2 diabetic patients / S. Gohari-Lasaki et al. *International Ophthalmology*. 2020. Vol. 40. P. 639–647. DOI: 10.1007/s10792-019-01224-3.

207. Association and in silico studies of ENPP1 gene variants with type 2 diabetes mellitus in a Northern Iranian population / A. Sharafshah et al. *Gene*. 2018. Vol. 675. P. 225–232. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.006.

208. Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in betaIRKO mice / K. Otani et al. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004. Vol. 286, Issue 1. E41–E49. DOI: 10.1152/ajpendo.00533.2001.

209. No Evidence of Association of ENPP1 Variants With Type 2 Diabetes or Obesity in a Study of 8,089 U.K. Caucasians / M. N. Weedon et al. *Diabetes*. 2006. Vol. 55, Issue 11. P. 3175–3179. DOI 10.2337/db06-0410.

210. The ENPP1 K121Q polymorphism is not associated with type 2 diabetes or obesity in the Chinese Han population / T. Zhao et al. *Journal of Human Genetics*. 2011. Vol. 56. P. 12–16. DOI: 10.1038/jhg.2010.124.

## ДОДАТКИ

### Додаток 1

#### Список публікацій здобувача

1. Марченко І. В., Дубовик Е. І., Ткач Г. Ф. Асоціація rs997509-поліморфізма гена ENPP1 с розвитком сахарного діабета 2-го типу в української 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 української 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](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](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 І. 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 XIX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених* (Тернопіль, 27–29 квіт. 2015 р.). Тернопіль, 2015. С. 281.
10. Грибова І. 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-практична конференція «*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 чтения В. В. Подвысоцкого*» (Одеса, 24–25 трав. 2018 р.). Одеса, 2018. С. 29.



## Додаток 2

### Відомості про апробацію результатів дисертації

1. XIX Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, Тернопіль 27-29 квітня 2015 р. – Публікація тез.
2. Global Students' Conference of Biomedical Sciences, Belgrade, Serbia (15-18 October 2015) – Публікація тез.
3. Республиканская научно-практическая конференция «Метаболический синдром: проблемы и достижения», Ташкент 10 апреля 2015 г. – Публікація тез.
4. II Международной научно-практической конференции «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», Алматы 23-24 апреля 2015 г. – Публікація тез.
5. European Human Genetics Conference: European Journal of Human Genetics (Barcelona 2016) – Публікація тез, постерна доповідь.
6. VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» м. Харків (5–7 жовтня 2016 р.) – Публікація тез, постерна доповідь.
7. XIV науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті», м. Харків (24-25 листопада 2016 р.) – Публікація тез.
8. Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасний мультидисциплінарний підхід до діагностики та лікування хворих на цукровий діабет», м. Тернопіль (11-12 травня 2017 р.) – Публікація тез.
9. Науковій конференції «XVI читання В.В. Підвисоцького», м. Одеса (18-19 травня 2017 р.); XXII Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених, м. Тернопіль (23-25 квітня 2018 р.) – Публікація тез, усна доповідь.

10. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ), м. Запоріжжя 17-18 травня 2018 р.) – Публікація тез.

11. Засідання кафедри фізіології і патофізіології із курсом медичної біології СумДУ (витяг з протоколу засідання №6 від 22 вересня 2020 року) – Усна доповідь.

## Додаток 3

### Акти впроваджень



Дворник В.М.  
2018 р.

#### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** Роль поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у розвитку цукрового діабету 2-го типу
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007.
3. **Джерело інформації**
  1. Марченко І.В. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з різними величинами ІМТ / І.В. Марченко, Д.А. Прасол // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2015. – №3(4). – С.543-549.
  2. Марченко І.В. Аналіз асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком артеріальної гіпертензії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2017. – Т. 17. – С.144-147
  3. Марченко І.В. Вплив K121Q поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток супутньої серцево-судинної патології у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко, В.Ю. Гарбузова, Є.Є. Марченко та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2017. – №5(2). – С.794-798
  4. Марченко І.В. Асоціація поліморфізму K121Q гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі / І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія Т.16, №4(62). С.54-57. DOI:10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.53
  5. Марченко І.В. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням / І.В. Марченко, Є.А. Гарбузова, С.І. Дубовик та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2018. – №6(1) – С.170-175
4. **Базова установа яка проводить впровадження:** кафедра патофізіології ВДНЗУ «Українська стоматологічна академія» Обговорено на засіданні кафедри 23.05.2018 р., протокол №18.
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2018 року.
6. **Форма впровадження:** в лекційний курс і практичні заняття при вивченні розділів «Патологія вуглеводного обміну. Цукровий діабет», «Роль спадковості у патології».
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач кафедри патофізіології  
ВДНЗУ «Українська медична  
стоматологічна академія»,  
д.мед.н., професор

В.О. Костенко

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи

Харківського національного

медичного університету



д.м.н., проф. В.Д. Марковський

2018 року

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень Марченко І.В. в навчальний процес

1. **Пропозиції для впровадження:** Роль поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у розвитку цукрового діабету 2-го типу
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007.
3. **Джерело інформації**
  1. Марченко І.В. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з різними величинами ІМТ / І.В. Марченко, Д.А. Прасол // J. Clin.Expr.Med. Res. – 2015. – №3(4). – С.543-549.
  2. Марченко І.В. Аналіз асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком артеріальної гіпертензії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2017. – Т. 17. – С.144-147
  3. Марченко І.В. Вплив K121Q поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток супутньої серцево-судинної патології у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко, В.Ю. Гарбузова, Є.Є. Марченко та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2017. – №5(2). – С.794-798
  4. Марченко І.В. Асоціація поліморфізму K121Q гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі / І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія Т.16, №4(62). С.54-57. DOI:10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.53
  5. Марченко І.В. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням / І.В. Марченко, Є.А. Гарбузова, Є.І. Дубовик та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2018. – №6(1) – С. 170-175
4. **Базова установа яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології імені Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2018 року.
6. **Форма впровадження:** в лекційний курс і практичні заняття при вивченні розділів «Порушення обміну вуглеводів. Цукровий діабет», «Роль спадковості у патології».
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

## Відповідальний за впровадження :

професор кафедри патологічної фізіології імені Д.О. Альперна  
Харківського національного медичного університету

О.М. Шевченко

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи  
ВДНЗ України «Буковинський державний  
медичний університет»

к.м.н., доц. Геруш І.В.  
2018 року



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень Марченко І.В. в навчальний процес

1. **Пропозиції для впровадження:** Роль поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у розвитку цукрового діабету 2-го типу
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007.
3. **Джерело інформації**
  1. Марченко І.В. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з різними величинами ІМТ / І.В. Марченко, Д.А. Прасол // J. Clin.Expr.Med. Res. – 2015. – №3(4). – С.543-549.
  2. Марченко І.В. Аналіз асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком артеріальної гіпертензії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2017. – Т. 17. – С.144-147
  3. Марченко І.В. Вплив K121Q поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток супутньої серцево-судинної патології у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко, В.Ю. Гарбузова, Є.Є. Марченко та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2017. – №5(2). – С.794-798
  4. Марченко І.В. Асоціація поліморфізму K121Q гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі / І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія Т.16, №4(62). С.54-57. DOI:10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.53
  5. Марченко І.В. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням / І.В. Марченко, Є.А. Гарбузова, Є.І. Дубовик та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2018. – №6(1) – С.170-175
4. **Базова установа яка проводить впровадження:** кафедра сімейної медицини Буковинського державного медичного університету.
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2018 року.
6. **Форма впровадження:** в лекційний курс і практичні заняття при вивченні розділів «Патологія вуглеводного обміну. Цукровий діабет», «Роль спадковості у патології».
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

**Відповідальний за впровадження :**  
завідувач кафедри сімейної медицини  
Буковинського державного медичного університету  
д.м.н., професор

Л.П. Сидорчук



ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор  
Сумського державного університету  
В.Д. Карпуша  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 року



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень Марченко І.В. в навчальний процес

1. **Пропозиції для впровадження:** Роль поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у розвитку цукрового діабету 2-го типу
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007.
3. **Джерело інформації**
  1. Марченко І.В. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з різними величинами ІМТ / І.В. Марченко, Д.А. Прасол // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2015. – №3(4). – С.543-549.
  2. Марченко І.В. Аналіз асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком артеріальної гіпертензії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2017. – Т. 17. – С.144-147
  3. Марченко І.В. Вплив K121Q поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток супутньої серцево-судинної патології у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко, В.Ю. Гарбузова, Є.Є. Марченко та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2017. – №5(2). – С.794-798
  4. Марченко І.В. Асоціація поліморфізму K121Q гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі / І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія Т.16, №4(62). С.54-57. DOI:10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.53
  5. Марченко І.В. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням / І.В. Марченко, Є.А. Гарбузова, Є.І. Дубовик та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2018. – №6(1) – С.170-175
4. **Базова установа яка проводить впровадження:** кафедра фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2018 року.
6. **Форма впровадження:** в лекційний курс і практичні заняття при вивченні розділів «Порушення вуглеводного обміну. Цукровий діабет», «Роль спадковості у патології».
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження :  
завідувач кафедри фізіології і  
патофізіології з курсом медичної біології  
Сумського державного університету  
д.м.н., професор

О.В. Атаман

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Т.в.о. проректора з науково-педагогічної роботи Одеського національного медичного університету МОЗ України  
д.мед.н., професор

Марічерда В.Г.

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 р.


### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень Марченко І.В. в навчальний процес

- 1. Пропозиції для впровадження:** Роль поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у розвитку цукрового діабету 2-го типу
- 2. Установа-розробник:** Сумський державний університет, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007.
- 3. Джерело інформації**
  1. Марченко І.В. Асоціація K121Q-поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу з різними величинами ІМТ / І.В. Марченко, Д.А. Прасол // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2015. – №3(4). – С.543-549.
  2. Марченко І.В. Аналіз асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком артеріальної гіпертензії у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2017. – Т. 17. – С.144-147
  3. Марченко І.В. Вплив K121Q поліморфізму гена *ENPP1* на розвиток супутньої серцево-судинної патології у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І.В. Марченко, В.Ю. Гарбузова, Є.Є. Марченко та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2017. – №5(2). – С.794-798
  4. Марченко І.В. Асоціація поліморфізму K121Q гена *ENPP1* із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі / І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова // Клінічна та експериментальна патологія Т.16, №4(62). С.54-57. DOI:10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.53
  5. Марченко І.В. Аналіз асоціації rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* з цукровим діабетом 2-го типу у пацієнтів з ожирінням / І.В. Марченко, Є.А. Гарбузова, Є.І. Дубовик та ін. // J. Clin. Exp. Med. Res. – 2018. – №6(1) – С.170-175
- 4. Базова установа яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України.
- 5. Термін впровадження:** січень-травень 2018 року.
- 6. Форма впровадження:** в лекційний курс і практичні заняття при вивченні розділів «Патологія вуглеводного обміну. Цукровий діабет», «Роль спадковості у патології».
- 7. Зауваження та пропозиції:** не вносились. Обговорено та затверджено на методичному засіданні кафедри загальної та клінічної патофізіології, протокол № 10 від 23 травня 2018 р.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедрою загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України  
д.мед.н., професор

  
Вастьянов Р.С.