

УДК 616.379-008.64+575.22

**Марченко І.В.**

## **АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ K121Q ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *ENPP1* ІЗ РОЗВИТКОМ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ**

Сумський державний університет

*Наведено результати дослідження асоціації цукрового діабету 2-го типу (ЦД 2-го типу) та артеріальної гіпертензії (АГ) за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у 163 хворих із ЦД 2-го типу і 110 здорових осіб за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Встановлено, що не існує асоціації між досліджуваним поліморфізмом гена *ENPP1* і розвитком АГ у пацієнтів із ЦД 2-го типу. Доведений зв'язок між артеріальною гіпертензією та розвитком ЦД 2-го типу незалежно від генотипу (K/KчиK/Q+Q/Q) за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*.*

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, ген *ENPP1*, поліморфізм генів.

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень «Роль алейного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб», № держ. реєстрації 0110U005038.

### **Вступ**

Цукровий діабет (ЦД) 2-го типу характеризується інсулінорезистентністю та відносною недостатністю інсуліну. У всьому світі на його частку припадає 80–90% всіх випадків цукрового діабету. Інсулінорезистентність характерна для всіх хворих незалежно від їх ваги та виникає за рахунок різноманітних факторів, включаючи генетичний, значення якого зростає в таких провокуючих умовах, як похилий вік, малорухомий спосіб життя та вісцеральне ожиріння. Все частіше у загальній популяції трапляється коморбідність артеріальної гіпертензії (АГ) та ЦД 2-го типу [1]. Дане поєднання патогенетично обґрунтоване наявністю інсулінорезистентності та гіперінсулінемії [2]. Поєднання АГ та ЦД 2 типу часто асоціюється з наявністю інших компонентів кластера метаболічних порушень – дисліпідемії та центрального ожиріння, що зумовлює зростання випадків ускладненого перебігу даної патології [3,4,5]. У зв'язку з широким поширенням АГ у хворих на ЦД 2-го типу, виникає інтерес досліджувати нові генетичні маркери, відповідальні за інсулінорезистентність та зростання рівня артеріального тиску в її умовах. Одним із таких генів-кандидатів є ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), який пригнічує передачу інсулінового сигналу після взаємодії гормону з рецептором. Мутація гену *ENPP1* призводить до порушення аутофосфорилування інсулінового рецептора, внаслідок чого, припиняється подальший каскад реакцій, необхідних для передачі сигналу інсуліну [6]. Досліджуваний поліморфізм K121Q (rs1044498) гена *ENPP1* знаходиться у 4 екзоні. Його суть полягає в тому, що у 43213-й позиції гена азотиста основа аденін заміщена на цитозин. Це призводить до заміни лізину (K) на глутамін (Q) у 121-му положенні молекули *ENPP1* [7]. Відомо, що у носіїв Q-алеля відбувається посилення інгібуючої активності білка *ENPP1* на інсуліновий рецептор, у порівнянні з гомозиготами по K-алелю [8]. Є дані про зв'язок K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з

розвитком ЦД в китайській, корейській, індійській, південноафриканській популяціях [9,10,11]. Щодо української популяції такі дані відсутні.

### **Мета дослідження**

Визначення розподілу алейних варіантів K121Q поліморфізму гена *ENPP1* у хворих із цукровим діабетом 2-го типу з нормальним і підвищеним артеріальним тиском (АТ) в українській популяції.

### **Матеріали і методи дослідження**

У дослідженні використано кров 163 хворих із ЦД 2-го типу (53,4% жінок і 46,6% чоловіків). Контрольна група складалася зі 110 пацієнтів, у яких відсутність ЦД 2 типу підтверджували шляхом збору анамнестичних даних та дослідження ряду біохімічних показників крові. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти підписали інформовану угоду на участь у дослідженні з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз. Для генотипування використовували венозну кров. ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Ізоген" (Росія). Ампліфікацію проводили у суміші специфічних праймерів: прямого (sense) 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' і зворотного (antisense) 5' GACGCTGGAAGATACCAGGCTG 3', 50-100 нг ДНК, 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 Од Taq-полімерази ("ThermoScientific", США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18

годин з 5 ОД рестриктази Eco47I (Avall) ("ThermoScientific", США). Наявність у 43213-й позиції гена *ENPP1* аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на цитозинрестриктазу Eco47I розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 238 п.о) на два фрагменти: 148 і 90 пар основ. Ампліфікати вивченого фрагмента гена *ENPP1* після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія). Одержані результати опрацьовували статистично з використанням пакету програм SPSS 17.0. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона та t-критерієм Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

**Результати дослідження та їх обговорення**

В таблиці 1 представлені результати геноти-

пування за досліджуваним поліморфізмом пацієнтів обох груп порівняння в залежності від наявності чи відсутності супутньої артеріальної гіпертензії. Серед практично здорових індивідумів співвідношення генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) в осіб з нормальною величиною АТ дорівнювало 78,4 і 21,6 %, а у тих, які мали супутню АГ – 69,4 і 30,6 %. Отже, у групі контролю розподіл генотипів в залежності від наявності чи відсутності супутньої АГ не виходив за межі статистичної значущості ( $P = 0,307$ ).

Серед хворих із цукровим діабетом 2-го типу спостерігались схожі результати. Так, в осіб з нормальною величиною АТ з К/К генотипом 71,9 %, а з К/Q + Q/Q генотипом – 28,1 %. Співвідношення алельних варіантів досліджуваного поліморфізму у хворих із ЦД 2-го типу, що страждали на АГ, становило 63,4 і 36,6 %. Отже, у хворих із ЦД 2-го типу не існує зв'язку між К121Q поліморфізмом гена *ENPP1* та розвитком АГ ( $P = 0,365$ ).

Таблиця 1  
Зв'язок К121Q поліморфізму гена *ENPP1* з артеріальною гіпертензією у групах порівняння

Немає ЦД	Генотип	АГ(-), n (%)	АГ(+), n (%)
	К/К	58 (78,4)	25 (59,4)
К/Q + Q/Q	16 (21,6)	11 (30,6)	
Разом		74 (100)	36 (100)
$\chi^2 = 1,044; P = 0,307$			
ЦД 2 типу	К/К	23 (71,9)	83 (63,4)
	К/Q + Q/Q	9 (28,1)	48 (36,6)
Разом		32 (100)	131 (100)
$\chi^2 = 0,820; P = 0,365$			

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

Таблиця 2  
Частота осіб з нормальною та підвищеною величиною артеріального тиску у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за К121Q поліморфізмом гена *ENPP1*

Генотип	Контроль, n (%)		ЦД 2-го типу, n (%)
	К/К	АГ(-)	58 (69,9)
АГ(+)		25 (30,1)	83 (78,3)
Разом		83 (100)	106 (100)
$\chi^2 = 44,126; P < 0,001$			
К/Q + Q/Q	АГ(-)	16 (59,3)	9 (15,8)
	АГ(+)	11 (40,7)	48 (84,2)
	Разом	27 (100)	57 (100)
$\chi^2 = 16,562; P < 0,001$			

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

У таблиці 2 наведено частоту осіб з наявністю чи відсутністю супутньої АГ у групах порівняння залежно від К121Q алельних варіантів гена *ENPP1*. Пацієнтів з К/К генотипом без супутньої АГ та з АГ у контролі було 69,9 і 30,1 %, а хворих із ЦД 2 типу – 21,7 і 78,3 % відповідно ( $P < 0,001$ ). Серед носіїв мінорного алеля К/Q + Q/Q осіб із нормальними значеннями АТ та супутньою АГ у контрольній групі було 59,3 і

40,7 %, а в групі хворих на ЦД 2-го типу – 15,8 і 84,2 % відповідно ( $P < 0,001$ ).

Таким чином, було встановлено достовірну асоціацію між супутньою артеріальною гіпертензією та розвитком ЦД 2-го типу незалежно від генотипу за К121Q поліморфізмом гена *ENPP1*.

Поділ дослідної і контрольної груп на дві підгрупи залежно від наявності чи відсутності АГ, представлено в табл. 3.

Таблиця 3  
Зв'язок К121Q поліморфізму гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу в осіб з нормальною та підвищеною величиною артеріального тиску

	Генотип	Контроль, n(%)	ЦД 2-го типу, n(%)
АГ(-)	К/К	58(78,4)	23(71,9)
	К/Q+Q/Q	16(21,6)	9(28,1)
	Разом	74(100)	32(100)
$\chi^2 = 0,542; P = 0,469$			
АГ(+)	К/К	25(69,4)	83(63,4)
	К/Q+Q/Q	11(30,6)	48(36,6)
	Разом	36(100)	131(100)
$\chi^2 = 0,458; P = 0,499$			

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

Проаналізувавши отримані дані, не виявлено асоціації досліджуваного K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з розвитком ЦД 2-го типу як в осіб із нормальними величинами АТ (P = 0,469), так і у пацієнтів з АГ (P = 0,499).

У таблиці 4 подано величини АТ сист., АТ діаст. та АТ пул. у практично здорових осіб і у пацієнтів із ЦД 2-го типу залежно від K121Q поліморфних варіантів гена *ENPP1*. В осіб контрольної групи з різними генотипами (К/К і К/Q + Q/Q) значення АТ сист. (P = 0,184) та

АТ діаст. (P = 0,630) достовірно не відрізнялись. Серед вивчених видів тисків лише АТ пул. в групі контролю у носіїв мінорного алеля К/Q + Q/Q був достовірно вищим, ніж у гомозигот за основним алелем К/К, і становив (47,2 ± 1,6) мм рт.ст. проти (43,4 ± 0,8) мм рт.ст. (P = 0,024). Щодо хворих на ЦД 2 типу, то величини АТ сист. (P = 0,115), АТ діаст. (P = 0,351) та АТ пул. (P = 0,153) у носіїв різних генотипів не відрізнялись.

Таблиця 4  
Показники артеріального тиску (АТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* (M ± m)

Показники		К/К	К/Q+Q/Q	F	P <sub>1</sub>
АТ сист.	Контроль (n)	123,9 ± 1,1(83)	126,9 ± 2,0(27)	0,261	0,184
	ЦД 2-го типу (n)	148,9 ± 2,0(106)	154,4 ± 2,9 (57)	0,168	0,115
	P <sub>2</sub>	< 0,001	< 0,001		
АТ діаст.	Контроль	80,4 ± 0,8	79,6 ± 1,4	0,590	0,630
	ЦД 2-го типу	89,2 ± 1,1	90,9 ± 1,4	0,184	0,351
	P <sub>2</sub>	< 0,001	< 0,001		
АТ пул.	Контроль	43,4 ± 0,8	47,2 ± 1,6	0,497	0,024
	ЦД 2-го типу	59,7 ± 1,5	63,5 ± 2,3	2,091	0,153
	P <sub>2</sub>	< 0,001	< 0,001		

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

Аналіз між групами порівняння показав, що хворі на ЦД 2 типу – гомозиготи за основним алелем (К/К) – мали достовірно вищі показники всіх видів тисків, ніж практично здорові особи.

Так, у хворих на ЦД 2 типу з К/К генотипом показник АТ сист. дорівнював (148,9 ± 2,0) мм рт.ст. проти (123,9 ± 1,1) мм рт.ст. у контролі (P < 0,001); АТ діаст. (89,2 ± 1,1) мм рт.ст. проти (80,4 ± 0,8) мм.рт.ст. (P < 0,001); АТ пул. (59,7 ± 1,5) мм рт.ст. проти (43,4 ± 0,8) мм.рт.ст. (P < 0,001).

У пацієнтів з генотипом К/Q + Q/Q за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* спостерігалися подібні результати. У носіїв мінорного алеля хворих із ЦД 2 типу показник АТ сист. дорівнював (154,4 ± 2,9) мм рт.ст. проти (126,9 ± 2,0) мм рт.ст. у контролі (P < 0,001). Величина АТ діаст. у групах порівняння становила (90,9 ± 1,4) мм рт.ст. та (79,6 ± 1,4) мм рт.ст. (P < 0,001). У здорових індивідуумів і хворих на ЦД 2-го типу, які були носіями мінорного алеля, показники АТ пул. також достовірно відрізнялись і дорівнювали (47,2 ± 1,6) мм рт.ст. та (63,5 ± 2,3) мм рт.ст. відповідно (P < 0,001). Таким чином, виявлено, що у пацієнтів із ЦД 2-го типу носіїв мінорного алеля величини АТ сист., АТ діаст. та АТ пул. Достовірно вищі, ніж в осіб контрольної групи.

Вивчення механізмів розвитку ЦД у поєднанні

з АГ залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини, тому що коморбідність цих патологій має спільний патогенетичний зв'язок і потенціє кардіоваскулярний ризик [4,12]. J.R. Sowers et al. у своїх роботах показали, що у хворих на цукровий діабет підвищення артеріального тиску зустрічається значно частіше, ніж у загальній популяції [13]. Як було показано раніше у дослідженні MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial), при однаковій вираженості різних факторів ризику на тлі ЦД їх «шкідливість» зростає в 3-4 рази [12,14]. D. Zhou et al. у своїх роботах зазначили про вплив на розвиток ЦД 2-го типу та АГ таких генів-кандидатів: *ESR*, *KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *ACE*, *CAPN 10* та *ENPP1* [15].

У проведених нами дослідженнях серед мешканців України не було виявлено асоціації між K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* та АГ у пацієнтів із ЦД 2-го типу. Подібні дані отримали R. Vasudevan et al. у своїх дослідженнях малайзійської популяції [17]. У роботі S. Vassì et al., при дослідженні пацієнтів Сицилії з інсулінорезистентністю, які не мали ожиріння, встановили, що значення АТ в осіб з різними генотипами за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* достовірно не відрізнялися [16].

**Висновки**

Не існує асоціації між K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* і розвитком АГ у пацієнтів із ЦД 2 типу. Незалежно від генотипу (K/K чи K/Q + Q/Q) встановлений зв'язок між артеріальною гіпертензією та розвитком ЦД 2-го типу. Як в осіб з K/K генотипом, так і в носіїв мінорного алеля, хворих із ЦД 2-го типу величини АТ сист., АТ діаст. та АТ пул. достовірно вищі, ніж в осіб контрольної групи.

**Перспективи подальших досліджень**

В подальшому планується продовжити вивчення асоціації K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з різними факторами ризику та з виникненням ускладнень ЦД 2 типу у пацієнтів різних за статтю, за генетичною схильністю і за наявністю супутньої серцево-судинної патології.

**Література**

1. Soriguer F. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus / F. Soriguer, L. Garrido Sanchez, S. Garcia-Serrano [et al.] // *Obes. Surg.* – 2009. – Vol. 19 (11). – P. 1574-1580.
2. Tian-Peng Z. The relationship between plasma apelin-12 level and hypertension, insulin resistance of type 2 diabetes mellitus patients / Z. Tian-Peng, G. Chang-Hui, Z. Ting-Ting [et al.] // *Chinese Journal of Gerontology.* – 2010. – Iss. 4. – P. 435-437.
3. St-Pierre D.H. Circulating obestatin levels in normal and type 2 diabetic subjects / D.H. St-Pierre, F. Settanni, I. Olivetti [et al.] // *J. Of Endocrinological Investigation.* – 2010. – № 33 (4). – P. 211-214.
4. Erdem G. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus / G. Erdem, T. Dogru, I. Tasci [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2008. – Vol. 116 (5). – P. 289-292.
5. Shiming X. Apelin and insulin resistance: another arrow for the quiver / X. Shiming, P.S. Tsao, Y. Patrick // *J. Diabetes.* – 2011. – Vol. 3 (3). – P. 225-231.
6. Goldfine I.D. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1 ecto nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in

the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I.D. Goldfine, B.A. Maddux, J.F. Youngren [et al.] // *Endocrine Rev.* – 2008. – № 29. – P. 62–75.

7. Gijbers R. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1 / R. Gijbers, H. Ceulemans, M. Bollen // *The Biochemical Journal.* – 2003. - Vol. 371, № 2. - P. 321–330.
8. Pizzuti A. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance / A. Pizzuti, L. Frittitta, A. Argiolas [et al.] // *Diabetes.* - 1999. - Vol. 48. - P. 1881–1884.
9. Prakash J. K121Q *ENPP1/PC-1* gene polymorphism is associated with insulin resistance in a North Indian population / J. Prakash, B. Mittal, S. Awasthi [et al.] // *Journal of Genetics.* – 2013. – Vol. 92 (3). – P. 571–576.
10. Li Y.Y. *ENPP1* K121Q polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese population: a meta-analysis including 11,855 subjects / Y.Y. Li // *Metabolism.* – 2012. – Vol. 61 (5). – P. 625–633.
11. El Achhab Y. Association of the *ENPP1* K121Q polymorphism with type 2 diabetes and obesity in the Moroccan population / Y. El Achhab, D. Meyre, N. Bouatia-Naji [et al.] // *Diabetes Metab.* – 2009. – Vol. 35 (1). – P. 37–42.
12. Stamler J. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks: US population data / J. Stamler, R. Stamler, J.D. Neaton // *Arch. Intern. Med.* – 1993. – Vol. 153. – P. 598–615.
13. Sowers J.R. Treatment of hypertension in patients with diabetes / J.R. Sowers // *Arch. Intern. Med.* – 2004. – Vol. 164. – P. 1850–1857.
14. Whitworth J.A. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension / J.A. Whitworth // *J. Hypertens.* – 2003. - Vol. 21. - P. 1983–1992.
15. Zhou D. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism is not associated with type 2 diabetes in a Chinese population / D. Zhou, R. Ruiter, J. Zhang [et al.] // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* - 2012. - Vol. 13 (3). - P. 372-378.
16. Bacci S. The K121Q polymorphism of the *ENPP1/PC-1* genes associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction / S. Bacci, O. Ludovico, S. Prudente [et al.] // *Diabetes.* – 2005. - Vol. 54, № 10. - P. 3021-3025.
17. Vasudevan R. No association of TCF7L2 and *ENPP1* gene polymorphisms in Malaysian type 2 diabetes mellitus with or without hypertension / R. Vasudevan, Ismail Patimah, Ali Aisyah, Mansor Mimi Soraya // *Research Journal of Biological Sciences.* – 2009. - Vol. 4, № 6. - P.703-709.

**Реферат**

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ K121Q ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *ENPP1* С РАЗВИТИЕМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Марченко И.В.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, ген *ENPP1*, полиморфизм генов.

Приведены результаты исследования ассоциации сахарного диабета 2-го типа (СД 2-го типа) и артериальной гипертензии (АГ) по K121Q полиморфизму гена *ENPP1* у 163 больных с СД 2-го типа и 110 здоровых лиц с помощью полимеразной цепной реакции. Установлено, что не существует ассоциации между исследуемым полиморфизмом гена *ENPP1* и развитием АГ у пациентов с СД 2-го типа. Доказана связь между артериальной гипертензией и развитием СД 2-го типа независимо от генотипа (K/Кили K/Q + Q/Q) по K121Q полиморфизму гена *ENPP1*.

**Summary**

ANALYSIS OF ASSOCIATION BETWEEN THE *ENPP1* K121Q GENE POLYMORPHISM AND DEVELOPMENT OF HYPERTENSION IN PATIENTS WITH DIABETES TYPE 2

Marchenko I.V.

Key words: diabetes type 2, the gene *ENPP1*, gene polymorphism.

This article describes the results obtained by studying association of diabetes mellitus type 2 (DM type 2) and arterial hypertension (AH) in K121Q *ENPP1* polymorphism gene. The study involved 163 patients with type 2 diabetes and 110 healthy individuals who made control group by polymerase chain reaction. It has been established that there is no association between the *ENPP1* gene polymorphism and the development of hypertension in patients with type 2 diabetes. There is the correlation between hypertension and the development of diabetes type 2, regardless of genotype (K / Keeley K / Q + Q / Q) on K121Q *ENPP1* polymorphism gene.