

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ K121Q ГЕНА ENPP1 ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ В ОСІБ РІЗНОЇ СТАТІ

І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова

Сумський державний університет, кафедра фізіології і патофізіології з курсом медичної біології, Суми

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

Клінічна та
експериментальна
патологія Т.16, №4
(62). С.54-57.

DOI:10.24061/1727-
4338.XVI.4.62.2017.53

E-mail: i.marchenko
@med.sumdu.edu.ua

Мета роботи - встановлення можливого зв'язку поліморфізму K121Q гена ENPP1 з ризиком розвитку цукрового діабету (ЦД) 2-го типу в осіб різної статі.

Матеріали і методи. Для дослідження використана венозна кров 163 хворих з ЦД 2-го типу (53,4 % жінок і 46,6 % чоловіків) та 110 практично здорових осіб (контрольна група). Визначення поліморфізму K121Q (rs1044498) гена ENPP1 проведено за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Статистичний аналіз виконано з використанням програми SPSS (версія 17.0).

Результати. У результаті генотипування осіб груп порівняння за поліморфним сайтом K121Q гена ENPP1 виявлено, що серед жінок із ЦД 2-го типу частота К/К-генотипу становить 64,7 %, К/Q+Q/Q - 35,3 %, а у контрольній групі - 78,1 і 21,9 % відповідно ($P = 0,063$). Щодо осіб чоловічої статі, то частота К/К-генотипу серед хворих із ЦД 2-го типу становила 71,1 %, К/Q+Q/Q - 28,9 %, у групі контролю - 74,4 і 25,6 % відповідно ($P = 0,645$).

Висновок. Не виявлено асоціації між K121Q поліморфізмом гена ENPP1 і розвитком цукрового діабету 2-го типу окремо серед осіб жіночої та чоловічої статі.

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

Клиническая и
экспериментальная
патология Т.16, №4
(62). С.54-57.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА K121Q ГЕНА ENPP1 С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА У ЛИЦ РАЗНОГО ПОЛА

І.В. Марченко, А.А. Зарва, Е.А. Гарбузова

Цель работы - установление возможной связи полиморфизма K121Q гена ENPP1 с риском развития сахарного диабета (СД) 2-го типа у лиц разного пола.

Материалы и методы. Для исследования была использована венозная кровь 163 больных с СД 2-го типа (53,4 % женщин и 46,6 % мужчин) и 110 практически здоровых лиц (контрольная группа). Определение полиморфизма K121Q (rs1044498) гена ENPP1 выполнено с помощью метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. Основную часть статистического анализа выполнено с использованием программы SPSS (версия 17.0).

Результаты. В результате генотипирования в группах сравнения по полиморфному сайту K121Q гена ENPP1 было выявлено, что среди женщин с СД 2-го типа частота К/К-генотипа составляет 64,7%, К/Q+Q/Q - 35,3%, а в контрольной группе - 78,1 и 21,9% соответственно ($P = 0,063$). В отношении лиц мужского пола, то частота К/К-генотипа среди больных с СД 2-го типа составила 71,1%, К/Q+Q/Q - 28,9%, в группе контроля - 74,4 и 25,6% соответственно ($P = 0,645$).

Вывод. Не существует ассоциации между K121Q полиморфизмом гена ENPP1 и развитием сахарного диабета 2-го типа отдельно среди лиц женского и мужского пола.

Key words: type 2
diabetes mellitus,
ENPP1 gene, gene
polymorphism.

Clinical and
experimental
pathology. Vol.16,
№4 (62). P.54-57.

THE GENDER DIFFERENCES IN THE ASSOCIATION OF ENPP1 GENE K121Q POLYMORPHISM WITH T2DM

I. Marchenko, A. Zarva, Ye. Harbuzova

Abstract. The aim of the present study was to analyze the frequency of ENPP1 gene K121Q polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in individuals of different sexes in Ukrainian population.

Material and methods. For this study, we used venous blood of 163 patients with T2DM (53.4% of women and 46.6% of men) and 110 healthy individuals (control group). Genotyping K121Q (rs1044498) polymorphism was performed using PCR-RFLP (polymerase chain reaction with following restriction fragment length polymorphism analysis) method. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science program (SPSS for Windows, version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). The differences were considered statistically significant with a P-value <0.05.

Results. As a result of the genotyping of the groups of comparison for the ENPP1 gene K121Q polymorphism, it was found that among women with type 2 diabetes, the

frequency of the K/K genotype is 64.7%, K/Q + Q/Q - 35.3%, and in the control group - 78.1 and 21.9% respectively ($P = 0.063$). For males, the frequency of the K/K genotype among patients with type 2 diabetes mellitus was 71.1%, K/Q + Q/Q - 28.9%, in the control group - 74.4 and 25.6 % respectively ($P = 0.645$).

Conclusion. There is no association between the ENPP1 gene K121Q polymorphism and the development of type 2 diabetes mellitus among the female and male subjects.

Вступ

Відомо, що у розвитку цукрового діабету (ЦД) 2-го типу існують статеві відмінності [1]. У першій половині минулого століття поширеність ЦД 2-го типу була вищою серед жінок, ніж серед чоловіків, але така тенденція поступово змінюється [2, 3]. Це відбувається за рахунок широкого поширення гіподинамії, особливо серед чоловіків, що призводить до збільшення кількості людей з ожирінням [4]. Сучасні дані показують, що у чоловіків діабет розвивається при більш низькому ступені ожиріння, ніж у жінок [5, 6]. Статеві відмінності в розподілі жиру в організмі, резистентність до інсуліну і рівень глюкози в крові вказують на наявність генетичних особливостей у розвитку цукрового діабету 2-го типу. Встановлення даних генетичних маркерів дали б змогу завчасно виявляти схильність до цукрового діабету [7, 8]. Алейний поліморфізм екзонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1) є одним з досліджуваних факторів у розвитку ЦД 2-го типу [9]. Ген ENPP1 розташований на довгому плечі 6 (6q23.2) хромосоми і кодує білок, який є одним із факторів, що визначають чутливість до інсуліну [10]. Алейний поліморфізм K121Q (rs1044498) розташований в 4 екзоні. Існують суперечливі дані про зв'язок поліморфізму K121Q гена ENPP1 з розвитком ЦД 2-го типу в різних популяціях світу [9].

Мета роботи

Визначення зв'язку поліморфізму K121Q гена ENPP1 із цукровим діабетом 2-го типу в осіб різної статі.

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-го 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, Гельсінської 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 виділяли, використовуючи набори "Ізоген". 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 Таq-полімерази ("Thermo Scientific", 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 (AvaII) ("Thermo Scientific", США). Наявність у 43213-й позиції гена ENPP1 аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на цитозин рестриктаза 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. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком").

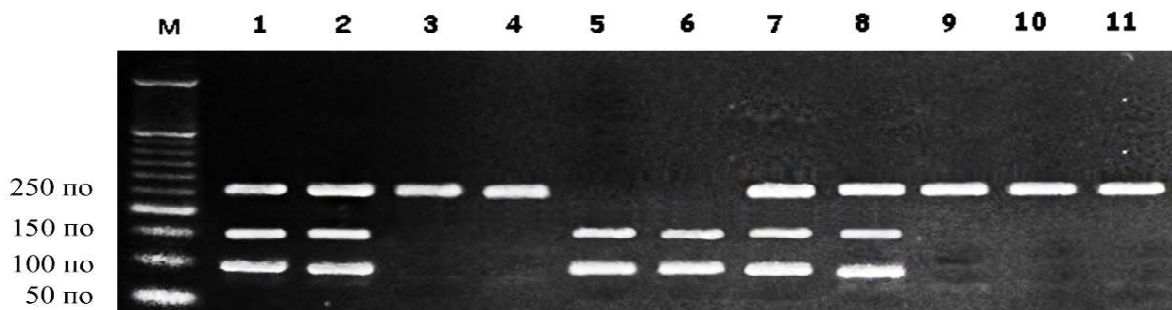


Рисунок. 1. Результати рестрикційного аналізу K121Q поліморфізму гена ENPP1. М - маркер молекулярної маси (п.о - пари нуклеїнових основ); доріжки 3,4,9,10,11 відповідають К/К-генотипу; доріжки 1,2,7,8 - К/К-генотипу; 5,6 - Q/Q-генотипу

Одержані результати опрацьовували статистично з використанням пакета програм SPSS 17.0. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Клінічна та експериментальна патологія. 2017. Т.16, №4 (62)

Результати та їх обговорення

Генотипування хворих з ЦД 2-го типу та осіб контрольної групи за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 дало змогу встановити частоту, з якою трапляються ок-

ремі варіанти цього гена в популяції, залежно від статевої приналежності, а також порівняти їх між групами загалом і за генотипами.

Враховуючи, що серед осіб контрольної групи не виявлено жодного пацієнта з генотипом Q/Q, для подальшого аналізу отриманих результатів, гетерозигот (K/Q) та гомозигот за мінорним алелем (Q/Q) об'єднано в одну групу (K/Q + Q/Q). На рисунку 2 наведено результати аналізу частот окремих генотипів за досліджуваним K121Q поліморфізмом гена ENPP1 серед пацієнтів контрольної групи та у хворих із цукровим

діабетом 2-го типу.

Аналізуючи отримані результати, бачимо, що у пацієнтів із ЦД 2-го типу розподіл алейних варіантів K/K та K/Q + Q/Q становив 65,0 і 35,0 %, а в контрольній групі - 75,5 і 24,5 % відповідно. Отже, відмінності у розподілі генотипів серед хворих із ЦД 2-го типу та здоровими пацієнтами не виходили за межі статистичної значущості ($\chi^2 = 3,35$; $P = 0,067$).

Нами проаналізовані дві групи, утворені за статтю пацієнтів. (табл.). При порівнянні частоти генотипів у дослідній і контрольній групах за поліморфізмом

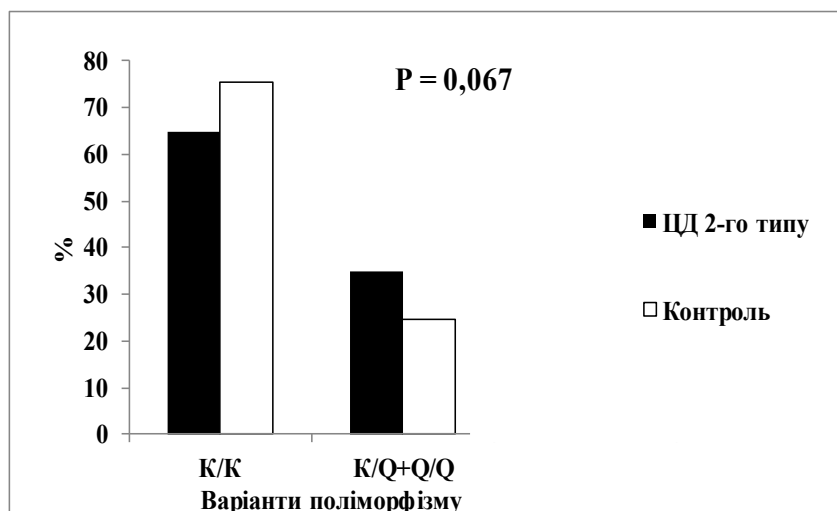


Рисунок 2. Частота алейних варіантів гена ENPP1 за поліморфізмом K121Q у хворих на ЦД 2-го типу (чорні стовпчики) і в контрольній групі (білі стовпчики). P - статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Таблиця
Розподіл частоти осіб із різними варіантами генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 серед жінок і чоловіків у контрольній групі та у хворих на цукровий діабет 2-го типу

Генотип	Жінки		Чоловіки	
	Контроль, n	ЦД 2-го типу, n	Контроль, n	ЦД 2-го типу, n
K/K	25	52	58	54
K/Q+Q/Q	7	35	20	22
	P ₁ = 0,063		P ₂ = 0,645	

Примітка: n – кількість осіб, P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів K/K і K/Q+Q/Q між особами жіночої статі у групах порівняння, P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів K/K і K/Q+Q/Q між особами чоловічої статі у групах порівняння

K121Q окремо у жінок і чоловіків зв'язку між даним генетичним маркером і ЦД 2-го типу виявити не вдалося. Так, жінок у групі хворих із ЦД 2-го типу з різними варіантами генотипів було 64,7 і 35,3 %, а у контрольній групі - 78,1 і 21,9 % відповідно ($\chi^2 = 3,451$; $P = 0,063$).

Під час порівняння розподілу алейних варіантів K121Q поліморфізму серед чоловіків хворих із ЦД 2-го типу та групою контролю достовірної відмінності виявлено не було. Частота генотипів за вивченим поліморфізмом у контрольній групі дорівнювала 74,4 і 25,6 %, а серед хворих із ЦД 2-го типу - 71,1 і 28,9 % відповідно ($\chi^2 = 0,212$; $P = 0,645$).

Аналізуючи результати досліджень інших вчених, виявлено ряд розбіжностей у запропонованих

відмінностях статевої приналежності у факторах ризику та результатах лікування як ЦД 2-го типу, так і для його ускладнень. Дані вказують на те, що чоловіки з ЦД 2-го типу страждають більше мікросудинними ускладненнями, тоді як жінки мають вищу захворюваність та смертність при серцево-судинних захворюваннях [2, 7]. Tanyolaç S et al. досліджуючи гендерні відмінності у взаємозв'язку поліморфних варіантів гена ENPP1 з ожирінням у турецькій популяції, показав, що існує асоціація між Q алелем поліморфізма K121Q та ожирінням лише у чоловіків [11]. У китайській популяції Wan C et al. стверджують, що у жінок з генотипом K/Q+Q/Q ожиріння трапляється значно частіше.

Висновки

1. Не виявлено асоціації між K121Q поліморфізмом гена ENPP1 і розвитком цукрового діабету 2-го серед представників української популяції.

2. Не встановлено зв'язку поліморфного локусу K121Q гена ENPP1 із ймовірністю настання ЦД 2-го типу окремо серед осіб жіночої та чоловічої статі.

Перспективи подальших досліджень

Продовжити вивчення асоціації K121Q поліморфізму гена ENPP1 з різними факторами ризику та з виникненням ускладнень ЦД 2-го типу у пацієнтів із наявністю супутньої серцево-судинної патології.

Представлену роботу виконано в рамках теми наукових досліджень "Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії" (держ. реєстр. номер 0117U003926).

Список літератури (References)

- Gale EA, Gillespie KM. Diabetes and gender. *Diabetologia*. 2001 Jan;44(1):3-15. doi: 10.1007/s001250051573.
- Nilsson PM, Theobald H, Journath G, Fritz T. Gender differences in risk factor control and treatment profile in diabetes: a study in 229 swedish primary health care centres. *Scand J Prim Health Care*. 2004 Mar;22(1):27-31.
- Shalev V, Chodick G, Heymann AD, Kokia E. Gender differences in healthcare utilization and medical indicators among patients with diabetes. *Public Health*. 2005 Jan;119(1):45-9. doi:

10.1016/j.puhe.2004.03.004.

4. Arnetz L, Ekberg NR, Alvarsson M. Sex differences in type 2 diabetes: focus on disease course and outcomes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014 Sep 16;7:409-20. doi: 10.2147/DMSO.S51301.

5. Szalat A, Raz I. Gender-specific care of diabetes mellitus: particular considerations in the management of diabetic women. *Diabetes Obes Metab*. 2008 Dec;10(12):1135-56. doi: 10.1111/j.1463-1326.2008.00896.x

6. Vistisen D, Witte DR, Tabak AG, Brunner EJ, Kivimaki M, Faerch K. Sex differences in glucose and insulin trajectories prior to diabetes diagnosis: the Whitehall II study. *Acta Diabetol*. 2014 Apr;51(2):315-9. doi: 10.1007/s00592-012-0429-7.

7. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med*. 2009;6(Suppl 1):60-75. doi: 10.1016/j.genm.2009.02.002.

8. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000 Dec;21(6):697-738. doi: 10.1210/edrv.21.6.0415.

9. Tang ST, Shen XR, Tang HQ, Wang CJ, Wei W, Zhang Q, et al. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in different populations: evidence based on 40 studies. *Endocr J*. 2014;61(11):1093-103.

10. Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven G, Accili D, Trischitta V, et al. The Role of Membrane Glycoprotein Plasma Cell Antigen 1/Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1 in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Related Abnormalities. *Endocr Rev*. 2008 Feb;29(1):62-75. doi: 10.1210/er.2007-0004.

11. Tanyolaç S, Mahley RW, Hodoglugil U, Goldfine ID. Gender Differences in the Relationship of ENPP1/PC-1 Variants to Obesity in a Turkish Population. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Nov;16(11):2468-71. doi: 10.1038/oby.2008.397.

Відомості про авторів:

Марченко І.В., аспірант кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету

Зарва А.О., студентка 3-го курсу медичного інституту Сумського державного університету

Гарбузова Є.А., студентка 4-го курсу медичного інституту Сумського державного університету

Сведения об авторах:

Марченко И.В., аспирант кафедры физиологии и патофизиологии с курсом медицинской биологии Сумского государственного университета

Зарва А.А., студентка 3-го курса медицинского института Сумского государственного университета

Гарбузова Е.А., студентка 4-го курса медицинского института Сумского государственного университета

Information about authors:

Marchenko I.V., postgraduate student of the Department of Physiology and Pathophysiology of Sumy State University

Zarva A.O., student of the 3rd year of Sumy State University

Harbuzova Ye.A., student of the 4th year of Sumy State University

Стаття надійшла до редакції 5.11.2017

Рецензент – проф. Л.П. Сидорчук

© І.В. Марченко, А.О. Зарва, Є.А. Гарбузова, 2017