



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50681 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 5/00
G01N 33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГРУПИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

1

(21) u200911392
(22) 09.11.2009
(24) 25.06.2010
(46) 25.06.2010, Бюл. № 12, 2010 р.
(72) КАРАЧЕНЦЕВ ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ГОРШУН-СЬКА МАР'ЯНА ЮРІЇВНА, АТРАМЕНТОВА ЛЮБОВ ОЛЕКСІЇВНА, ПОЛТОРАК ВІКТОРІЯ ВІТАЛІЇВНА, ТИЖНЕНКО ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА, ПОЧЕРНЯЄВ АРТЕМ КОСТЯНТИНОВИЧ
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ" (ДУ ІПЕП)

(57) Спосіб визначення групи ризику розвитку цукрового діабету 2 типу за допомогою генетичних маркерів, який відрізняється тим, що для слов'ян України як маркер використовують одонуклеотидний поліморфізм Q192R гена PON-1 і в разі наявності гомозиготного генотипу роблять висновок про підвищений ризик виникнення цукрового діабету 2 типу.

Корисна модель відноситься до галузі медичної генетики і може бути використана для визначення осіб, що мають підвищений ризик розвитку цукрового діабету 2 типу з метою проведення профілактичних заходів щодо попередження цього захворювання.

Визначення групи ризику відносно захворювань із спадковим компонентом, до яких відноситься і цукровий діабет 2 типу, - одна з першорядних задач медичної генетики [2]. Група підвищеного ризику визначається для того, щоб проводити цілеспрямовану профілактику і, таким чином, знижувати ймовірність розвитку цукрового діабету у осіб, які мають спадкову схильність до цього захворювання, що повинно призвести до зменшення числа хворих на цукровий діабет.

Існують різні методи визначення групи ризику щодо захворювань із спадковим компонентом. Ризик для індивіда оцінюють за його родоводом, за наявністю морфо-функціональних предикторів, білкових і ДНК-маркерів [1]. Кожний з методів має свої переваги й недоліки. Аналіз родоходів - найбільш дешевий метод. Інша його перевага полягає в тому, що він дає інформацію про специфічну генетичну схильність до захворювання, а недоліком є те, що інформацію дослідник одержує від пацієнта, і тому вона може бути ненавмисно або навмисно перекручена. Морфо-фізіологічні предиктори (індекс маси тіла, дерматогліфічні характеристики, групи крові та ін.) є більш об'єктивними, але й більш затратними. Крім того, асоціації бага-

тьох морфо-фізіологічних чинників з захворюванням не відбивають функціональних зв'язків. Використання ДНК-маркерів свідчить про сучасний рівень діагностики. Перевагою такого підходу є те, що дослідження особливостей ДНК дає можливість зрозуміти механізм формування захворювання. До недоліків методу відноситься його поки ще висока вартість, однак, накопичення даних є роботою на перспективу, коли ці методи з розвитком технології стануть дешевшими.

Стратегія визначення групи ризику відносно захворювань із спадковою схильністю, зокрема до цукрового діабету, складається не з того, щоб знайти єдиний абсолютно надійний маркер. Це неможливо у принципі для полігенних захворювань, для яких часто пусковим механізмом є умови середовища, а в тому, щоб, використовуючи комплекс різних предикторів і маркерів, доводити прогноз до необхідного рівня ймовірності. У зв'язку з цим використання будь-якого нового чинника, що дозволяє уточнити ризик, цілком виправдано. Кожний новий маркер робить додатковий внесок в оцінку ризику, тому розширення їх переліку дозволяє підвищити точність діагностики.

Існуючі молекулярні маркери, хоча й вказують на ту чи іншу величину ризику, однак, необхідно враховувати, що їх діагностична значущість неоднакова в різних популяціях [5, 7, 9-14]. Маркери мають етнспецифічне й локально-популяційне інформаційне навантаження. Неспівпадань результатів, які одержані в роботах, присвячених

(19) UA (11) 50681 (13) U

пошуку генетичних маркерів захворювань із спадковим компонентом, в тому числі і цукрового діабету, пов'язане з тим, що в них зазвичай мають на увазі людину взагалі, а не представника визначеної етнічної групи, члена конкретної популяції, що еволюціонувала в унікальних клімато-географічних умовах.

Задача корисної моделі: розробка способу визначення групи ризику відносно розвитку цукрового діабету серед слов'ян України.

Поставлена задача вирішується тим, що при визначенні групи ризику розвитку цукрового діабету 2 типу за допомогою генетичних маркерів, для слов'ян України в якості маркера використовують одонуклеотидний поліморфізм Q192R гену PON1 і в разі наявності гомозиготного генотипу роблять висновок про підвищений ризик виникнення цукрового діабету 2 типу.

Технічний результат - розширення переліку маркерів ризику розвитку цукрового діабету етнотипічних для слов'ян України, що дозволить підвищити точність діагностики цього захворювання в даній популяції.

Одонуклеотидний поліморфізм гену PON-1, що призводить до зміни активності параоксонази, є несинонімічною заміною Q192R SNP в Region Ex6+78A>G [8]. Ця заміна пов'язана із продукцією двох ізоферментів, що розрізняються амінокислотними залишками – глютаміновим (Q) або аргініновим (R) - в позиції 192 активного центру фермента [16].

Заявлений спосіб реалізується таким чином. У особи, що досліджується, забирають 10мл венозної крові. ДНК виділяється з лейкоцитів за допомо-

гою іонообмінної смоли Челекс-100 (ChelexR100) [15]. Одонуклеотидну заміну, яка призводить до зміни в амінокислотній послідовності параоксонази у позиції 192 з глютаміну на аргінін, визначають шляхом ампліфікації в полімеразній ланцюговій реакції фрагмента гену розміром 199 пар нуклеотидів з наступним гідролізом ендонуклеазою BspPI.

Використовують прямий (PON192F TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG) і зворотний (PON192R GACATACTTGCCATCGGGTGA) праймери [12]. В якості маркера молекулярної маси використовують ДНК pUC19, гідролізовану ендонуклеазою MspI. Розділення фрагментів ДНК після рестрикції проводять за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі. Генотип особи, що досліджується за геном PON-1 визначають за електрофореграмою ПЛР-продуктів (Фіг.1). Одна смужка, що відповідає фрагменту ДНК розміром 199 пар нуклеотидів (зразки 1-4, 6 і 9) вказує на генотип QQ. Дві смужки, що вказують на фрагменти ДНК довжиною 135 і 64 пари нуклеотидів (зразок 8) вказують на генотип RR. Три смужки ДНК розміром 199, 135 і 64 пари нуклеотидів (зразки 5 і 7) вказують на генотип QR.

За нашими даними, частоти алелей гена PON-1 значуще не відрізняються у чоловіків і жінок, а також у росіян і в українців [4], а також у хворих на цукровий діабет 2 типу і здорових людей [3]. Розбіжності між хворими і здоровими стосуються розподілу генотипів: у хворих на цукровий діабет 2 типу спостерігається надлишок обох гомозигот QQ і RR, і нестача гетерозигот QR (табл. 1).

Таблиця 1

Частоти генотипів за одонуклеотидним поліморфізмом гена у хворих на цукровий діабет 2 типу і здорових людей

Група	Генотип, %		
	QQ	QR	RR
Здорові	39,02±4,42	52,03±4,52	8,94±2,58
Цукровий діабет 2 типу	57,29±5,08	26,04±4,50	16,67±3,82

На підставі цих даних одержані показники відносного ризику. Для індивіда з генотипом QQ ймовірність захворіти на цукровий діабет 2 типу в 1,46 рази перевищує середнє популяційне значення, для індивіда з генотипом RR ризик підвищений в

1,86 разів. Гетерозиготність за поліморфізмом Q192R PON1 є фактором антиризiku щодо розвитку цукрового діабету 2 типу - ймовірність захворювання для індивіда з генотипом QR в два рази менша, ніж в середньому в популяції (табл. 2).

Таблиця 2

Оцінка ризику захворювання на цукровий діабет 2 типу в залежності від генотипу за одонуклеотидним поліморфізмом

Чинник	Генотип, %		
	QQ	QR	RR
Відносний ризик	1,46±0,14	0,50±0,19	1,86±0,37
95% довірчий інтервал	1,18-1,74	0,12-0,88	1,13-2,60

Спосіб було апробовано в клініці ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського» АМН України на 96 хворих на цукровий діабет 2 типу.

Для оцінки ризику розвитку цукрового діабету 2 типу підраховували показник відношення шансів OR [6] за допомогою чотирьохпільної таблиці. Якщо клітини таблиці позначити а (хворий з наявніс-

тю даного генотипу), b (хворий без даного генотипу), c (здоровий з даним генотипом), d (здоровий, що не має даного генотипу), то відношення шансів дорівнює:

$$OR=ad/bc.$$

Для знаходження статистичної похибки показника OR використовували логарифмічну шкалу. Для цього знаходили натуральний логарифм OR (lnOR), а його статистичну похибку S_{lnOR} розраховували за формулою:

$$S_{lnOR}=\sqrt{(1/a+1/b+1/c+1/d)}.$$

Статистичну похибку S_{lnOR} використовували для знаходження довірчого інтервалу (ДІ) логарифма відношення шансів ln OR:

$$ДІ: \ln OR \pm t S_{lnOR}$$

де t - критерій Стюдента (для 95% ДІ t=2).

Потім за допомогою операції експонування знаходили довірчий інтервал для OR.

$$95\% \text{ ДІ OR: } \exp(\ln OR - t S_{lnOR}) \div \exp(\ln OR + t S_{lnOR})$$

Отримані дані наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Відношення шансів для різних генотипів

Генотип	Вихідні дані				OR	lnOR	S_{lnOR}	95 ДІ OR
	a	b	c	D				
RR	16	80	11	112	2,04	0,71	0,42	0,89-4,71
QQ	55	41	48	75	2,10	0,74	0,28	1,20-3,67
QQ.RR	71	25	59	64	3,08	1,12	0,29	1,74-5,41
QR	25	71	64	59	0,32	-1,14	0,29	0,18-0,57

Як свідчать дані табл. 3, генотип RR збільшує шанс захворіти на цукровий діабет 2 типу в два рази, а генотип QQ - в 2,1 рази. Гомозиготність за вивченим поліморфізмом збільшує, а гетерозиготність (QR) зменшує ймовірність захворіти на цукровий діабет в три рази.

Таким чином розроблений спосіб дозволяє підвищити точність визначення ризику розвитку ЦД серед слов'ян України.

Література:

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. [Текст] / Н.П. Бочков. - М.: Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2004. - 480с.
2. Гинтер Е.К. Медицинская генетика [Текст] / Е.К. Гинтер. - М.: Медицина, 2003. - 448с.
3. Поліморфізм Q192R гена PON-1 у больных сахарным диабетом 2 типа [Текст] / М.Ю. Горшунская, Ю.И. Караченцев, Л.А. Атраментова [и др.] // Цитология и генетика, (в печати).
4. Поліморфізм гена параоксоназы (PON-1) у славянської частини населення Харківська [Текст] / А.К. Почерняев, Т.В. Тыжненко, М.Ю. Горшунська [и др.] // Цитология и генетика. - 2009. - Т.43. - №5. - С.64-68.
5. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUM-PONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns [Text] / M. Antikainen, S. Murtomaki, M. Syvanne [et al.] // J. Clin. Invest. - 1996. - Vol.98. - P.883-885.
6. Armitage P. Statistical methods in medical research [Text] / P. Armitage, G. Berry - 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, 1994. - 620p.
7. Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population [Text] / Q. Huang, Y.H. Lui, Q.D. Yang [et al.] // Neurol. Res. - 2006. - Vol.28 (5). - P.549-554.
8. GenBank is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences [Electronic resource]. - Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

9. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetes complication in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus [Text] / Y. Ikeda, T. Suchiro, M. Inoue [et al.] // Metabolism. - 1998. - Vol.47., N5. - P.598-602.

10. Paraoxonase-I (PON1) activity, but not PON1 (Q192R) phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-ages Serbian population [Text] / J. Kotur-Stevuljevic, S. Spasic, A. Stefanovic [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. - 2006. - Vol.44 (10). - P.1206-1213.

11. Odawara M, Tachi Y, Yamashitya K. Paraoxonase polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus [Text] / M. Odawara, Y. Tachi, K. Yamashitya // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1997. - Vol.82. - P.2257-2260.

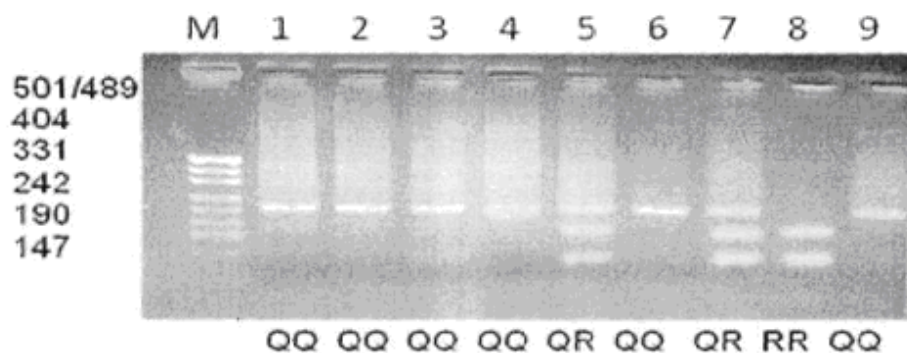
12. Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients [Text] / D. Ombres, G. Pannitteri, A. Montali [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. - 1998. - Vol.18. - P.1611-1616.

13. Paraoxonase phenotype distribution in a healthy Iranian population [Text] F. Sepahvand, M. Shafiei, S. Ghaffari [et al.] // Basic Clin Pharmacol Toxicol. - 2007. - Vol.101 (2). - P.104-107.

14. Paraoxonase 192 Gln-Arg polymorphism an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults [Text] / B. Voetsch, M. Kelly, S. Benke [et al.] // Stroke. - 2002. - Vol.33. - P.1459-1464.

15. Walsh, P.S. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [Text] / P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // BioTechniques. - 1991. - №10. - P.506-513.

16. Paraoxonase (Pon1) Q192R polymorphism and serum PON1 activity in diabetic patients on maintenance hemodialysis [Text] / B. Zhang, S. Eto, P. Fan [et al.] // Clin. Nephrol. - 2003. - Vol.60(4). - P.257-265.



Електрофореграма продуктів ППР специфічної послідовності ДНК, генотипованої за SNP-поліморфізмом гена PON-1 в Region Ex6+78A>G. (M - маркер молекулярної маси ДНК рUC19, гідролізованої ендонуклеазою MspI 1-9 - ДНК донорів з різними генотипами).

Фіг.1