

## Συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων CLOCK με την παρουσία σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σε ηλικιωμένο ελληνικό πληθυσμό\*

Ξ. Τσεκμεκίδου<sup>1</sup>  
Θ. Κουφάκης<sup>1</sup>  
Φ. Τσέτσος<sup>2</sup>  
Μ. Γεωργίτση<sup>2,3</sup>  
Μ. Θεοδορίδης<sup>4</sup>  
Ν. Παπάνας<sup>5</sup>  
Π. Πάσχου<sup>2</sup>  
Κ. Κώτσα<sup>1</sup>

### Περίληψη

**Εισαγωγή, Σκοπός:** Πρόσφατα δεδομένα ενισχύουν τη θεώρηση ότι διαταραχές του κικκάδιου ρυθμού εμπλέκονται στην παθογένεια του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔτ2), προκαλώντας διακυμάνσεις στα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος, στην έκκριση της ινσουλίνης αλλά και την ευαισθησία στη δράση της, στην κατανάλωση ενέργειας και την έκφραση γονιδίων σε ήπαρ και πάγκρεας. Σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση πιθανής συσχέτισης των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού (γονίδια CLOCK) με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 σε ηλικιωμένο ελληνικό πληθυσμό.

**Υλικό – Μέθοδοι:** Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 1285 ηλικιωμένοι άνω των 65 ετών, οι οποίοι ταξινομήθηκαν είτε στην ομάδα ασθενών με ΣΔτ2 (ομάδα Α, n=716) με βάση το ιστορικό ΣΔτ2, την τιμή της HbA1c  $\geq 6,5\%$  και γλυκόζης νηστείας (FPG)  $\geq 126$  mg/dl, είτε στην ομάδα μη διαβητικών (ομάδα Β, n=569). Μετά τη γραπτή συγκατάθεση, απομονώθηκε γενετικό υλικό και η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε σε αναλυτή της Illumina Infinium PsychArray. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων PPARA, PPARC, CLOCK/TMEM165, PER1, PER2 και PER3 επιλέχθηκαν και έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων μεταξύ των ομάδων (πρώτη ανάλυση). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα PLINK και η μέθοδος ανάλυσης μετάθεσης. Η τιμή του  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Για να μειωθεί η πιθανότητα παρουσίας προδιαβήτη στον πληθυσμό, οι συμμετέχοντες στην ομάδα Β με επίπεδα HbA1c  $< 5,7\%$  και γλυκόζης νηστείας  $< 100$  mg/dl σχημάτισαν μια υποομάδα (ομάδα Γ, n=393) και ακολούθησε μια δεύτερη ανάλυση.

**Αποτελέσματα:** Στην πρώτη ανάλυση, μεταξύ ομάδων Α και Β, αναδείχθηκε μια πιθανή προστατευτική δράση 14 πολυμορφισμών του PPARA. Ομοίως, οι πολυμορφισμοί rs7291444\_G/T (pemp=0,031, OR=0,7843), rs36125344\_C/G (pemp=0,043, OR=0,758) και rs6008384\_C/T (pemp=0,036, OR=0,798) στο PKDREJ, που γειτνιάζει με το PPARA, ενδεχομένως να προστατεύουν από τον ΣΔτ2, όπως φάνηκε και στις 2 αναλύσεις. Ο πολυμορφισμός rs2859389 στο UTS2, πλησίον του PER2, φαίνεται να προστατεύει από τον ΣΔτ2

<sup>1</sup> Τμήμα Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Διαβητολογικό Κέντρο, Α΄ Παθολογική Κλινική ΠΓΝ ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup> Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

<sup>3</sup> Εργαστήριο Βιολογίας και Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

<sup>4</sup> Τμήμα Νεφρολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

<sup>5</sup> Διαβητολογικό Κέντρο, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

\* Η εργασία βραβεύτηκε στο πλαίσιο του 34ου Πανελληνίου Ετήσιου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης και Εκπαίδευσης για τον Σακχαρώδη Διαβήτη, 10-14/11/2021, Θεσσαλονίκη.

( $p_{\text{emp}}=0,046$ ,  $OR=0,8454$ ). Ενδιαφέρον προκαλεί ο πολυμορφισμός rs6744132\_A/G, που βρίσκεται μεταξύ των HES6 και PER2 και σχετίζεται θετικά με τη νόσο ( $p_{\text{emp}}=0,044$ ,  $OR=1,183$ ). Τέλος, μόνο στη δεύτερη ανάλυση, φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση ο πολυμορφισμός rs2278637\_G/T ( $p_{\text{emp}}=0,015$ ,  $OR=0,784$ ) στο VAMP2, που γειτνιάζει με το PER1, καθώς και ο πολυμορφισμός rs11943456 ( $p_{\text{emp}}=0,018$ ,  $OR=0,787$ ) στο CLOCK/ TMEM165.

**Συμπεράσματα:** Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι ενδεικτικά συσχέτισης των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού με την παρουσία ΣΔτ2 στον υπό μελέτη πληθυσμό. Η μικρή ετερογένεια των αποτελεσμάτων, αλλά και η απουσία τεκμηριωμένης πρωτεϊνικής μεταβολής αντανάκλα την πολυπλοκότητα της παθογένειας του ΣΔτ2. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που θα αναζητήσουν τους πιθανούς μηχανισμούς που συνδέουν τις διαταραχές του κικκάδιου ρυθμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔτ2.

## Συντμήσεις

Άνω 95: Ανώτερο όριο OR με 95%CI

ΓΝ: Γλυκόζη νηστείας

ΔΜΣ: Δείκτης μάζας σώματος

HbA1c: Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη

OR: Λόγος πιθανοτήτων

$p_{\text{emp}}$ :  $p$  που προκύπτει με τη μέθοδο της μετάθεσης

SD: Τυπική απόκλιση

Κάτω 95: Κατώτερο όριο OR με 95%CI

MNP: Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός

MAF: Συχνότητα υπολειπόμενου αλληλομόρφου

ΣΔτ2: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

## Εισαγωγή

Οι κικκάδιοι ρυθμοί είναι μια βιολογική διαδικασία που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή στη διάρκεια ενός 24ώρου. Παρ' όλο που οι κικκάδιοι ρυθμοί είναι ενδογενείς, προσαρμόζονται στο τοπικό περιβάλλον από εξωγενείς παράγοντες, πιο σημαντικός από τους οποίους είναι το φως της ημέρας. Οι κικκάδιοι ρυθμοί φαίνεται να ελέγχουν σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως η εναλλαγή ύπνου-εγρήγορης, η έκκριση ορμονών, η θερμορύθμιση, η ομοιοστάση ενέργειας και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.<sup>1</sup> Το κικκάδιο σύστημα αποτελείται από ένα βιολογικό «ρολόι» που βρίσκεται στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου και από σειρά περιφερικών «ρολογιών», που συνεργικά ρυθμίζουν την ημερησία διακύμανση πολλών βιολογικών διεργα-

σιών.<sup>2</sup> Ο υπερχιασματικός πυρήνας είναι υπεύθυνος για την αναπαραγωγή των κικκάδιων ρυθμών και για τον λόγο αυτό αποκαλείται και ενδογενής βιολογικός βηματοδότης.<sup>3</sup>

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μία χρόνια διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, δυνητικά επικίνδυνη για τη ζωή, με τεράστιες οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς τις τελευταίες δεκαετίες η έκταση του προβλήματος τείνει να πάρει διαστάσεις επιδημίας.<sup>4</sup> Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ο πληθυσμός των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη ήταν 422 εκατομμύρια το 2014, γεγονός που εδραιώνει τον παγκόσμιο επιπολασμό του διαβήτη σε 8,5%. Το 2012, περίπου 2,2 εκατομμύρια θάνατοι αποδόθηκαν σε υψηλές τιμές γλυκόζης, ενώ το 2015 υπολογίστηκε ότι 1,6 εκατομμύρια θάνατοι οφείλονται στον σακχαρώδη διαβήτη. Ο ΠΟΥ προβλέπει ότι μέχρι το 2030 ο διαβήτης θα αποτελεί την 7η αιτία θανάτου παγκοσμίως.<sup>5</sup> Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνονται με την 9η έκδοση του Παγκόσμιου Άτλαντα για τον σακχαρώδη διαβήτη όπως αυτός εκδίδεται από την Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη (IDF – International Diabetes Federation). Ειδικότερα, στην έκδοση του 2019 καταγράφονται συνολικά 463 εκατομμύρια ασθενείς με διαβήτη παγκοσμίως, ενώ προβλέπεται μέχρι το 2045 εκρηκτική άνοδος με αύξηση του επιπολασμού και πληθυσμό διαβητικών στα 700 εκατομμύρια.<sup>6</sup> Ο ΣΔ σχετίζεται με διπλάσιο έως τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου στους ενήλικες.<sup>7</sup> Είναι αδιαμφισβήτητο ότι αυτή η παγκόσμια επιδημία επιδρά όχι μόνο στη δημόσια υγεία, αλλά και γενικότερα στην κοινωνία και την οικονομία. Παρά την αλματώδη πρόοδο στην αντιμετώπιση του ΣΔτ2, η παθογένεια της νόσου δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Ο ΣΔτ2 είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους εμπλέκονται σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια.

Δεδομένα επιδημιολογικών μελετών τονίζουν την ύπαρξη συσχέτισης διαταραχών των κικκάδιων ρυθμών με την αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακής νόσου, καρκίνου, φλεγμονωδών νοσημάτων, παχυσαρκίας και ΣΔ.<sup>8</sup> Σε μελέτη επίδρασης των διαταραχών των κικκάδιων ρυθμών στους προγνωστικούς παράγοντες που επιβαρύνουν την εμφάνιση παχυσαρκίας, ΣΔ και καρδιαγγειακής νόσου, δείχθηκε ότι τόσο οι οξείες μεταβολές, όπως π.χ. το jet lag, όσο και

οι χρόνιες μεταβολές, π.χ. η εργασία σε νυχτερινή βάρδια, φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά τον καρδιομεταβολικό κίνδυνο.<sup>9</sup> Γενετικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων που συμμετέχουν στην εύρυθμη λειτουργία του βιολογικού «ρολογιού», έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου, παχυσαρκίας, ΣΔ και υπέρτασης.<sup>10,11</sup>

Το *Clock circadian regulator (CLOCK)/Transmembrane Protein(TMEM)165* είναι ένα γονίδιο σύνηξης που εδράζει στο χρωμόσωμα 4. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί παρουσιάζει κεντρικό ρόλο στον προγραμματισμό των κιρκάδιων ρυθμών και οι πολυμορφισμοί του πιθανόν να σχετίζονται με συμπεριφορικές αλλαγές σε συγκεκριμένους πληθυσμούς καθώς και με την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο. Ανεπάρκεια του TMEM165 μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα Golgi.<sup>12</sup> Τα γονίδια *peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)* και *peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARD)* κωδικοποιούν τους αντίστοιχους πυρηνικούς υποδοχείς που παρουσιάζουν σημαντική δράση στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Οι PPARA είναι άμεσοι ρυθμιστές των επιμέρους στοιχείων-τμημάτων του κεντρικού ρολογιού, ενώ οι PPARD έχουν έμμεση επίδραση στο κιρκάδιο ρολόι.<sup>13</sup> Τα γονίδια *period circadian regulator 1, 2 και 3 (PER1, PER2, PER3)* ανήκουν στην οικογένεια των γονιδίων *Period* και εκφράζονται στον υπερχιασματικό πυρήνα, τον κατεξοχήν κύριο κιρκάδιο βηματοδότη στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Πολυμορφισμοί των γονιδίων αυτών μέχρι τώρα έχουν συσχετιστεί με διαταραχές ύπνου.<sup>14,15</sup>

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης των γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού με την παρουσία ΣΔτ2 σε ηλικιωμένο πληθυσμό. Είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται μια τέτοιου είδους μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό.

## Υλικά και Μέθοδοι

Συνολικά συμμετείχαν στη μελέτη 1.285 άτομα. Ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΔτ2 επιλέχθηκαν από τακτικά εξωτερικά ιατρεία των Διαβητολογικών Κέντρων του ΠΓΝ ΑΧΕΠΑ και του ΠΓΝ Αλεξανδρούπολης. Από τις ίδιες γεωγραφικά ευρύτερες περιοχές επιλέχθηκε η ομάδα ελέγχου, στην οποία επιβεβαιώθηκε η απουσία διαβήτη τόσο με τη μέτρηση επιπέδων γλυκόζης νηστείας (ΓΝ) όσο και γλυκοζυ-

λιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Έγινε καταγραφή των δημογραφικών και σωματομετρικών παραμέτρων καθώς και του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού. Κριτήρια εισαγωγής στην ομάδα ελέγχου ήταν: (α) ηλικία >65 έτη, (β) επίπεδα HbA1c <6,5%, (γ) ΓΝ <126 mg/dl, (δ) απουσία προηγηθείσας διάγνωσης ΣΔτ2 ή αναφερόμενης υπεργλυκαιμίας και (ε) απουσία προηγούμενης ή παρούσας λήψης αντιδιαβητικής αγωγής. Η διάγνωση του ΣΔτ2 βασίστηκε στα διαγνωστικά κριτήρια της Αμερικανικής Διαβητολογικής Εταιρείας του 2010.<sup>16,17</sup> Ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο ή προκαλούμενο ΣΔτ2 λόγω ηπατικής ανεπάρκειας ή λήψης στεροειδών ή άλλης φαρμακευτικής αγωγής που προκαλεί υπεργλυκαιμία αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Συνολικά, στην ομάδα του διαβήτη συμμετείχαν 716 ασθενείς (ομάδα Α), ενώ στην ομάδα ελέγχου (ομάδα Β) 569 άτομα πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής. Όλοι ήταν κάτοικοι της Κεντρικής Μακεδονίας και Θράκης καθώς και ελληνικής εθνικότητας και καταγωγής. Για την αποφυγή παρουσίας περιπτώσεων προδιαβήτη στην ομάδα ελέγχου, επιλέχθηκε από την ομάδα Β, μία υπο-ομάδα με 393 συμμετέχοντες με τιμή α) HbA1c <5,7% και β) ΓΝ <100 mg/dl, η οποία ονομάστηκε ομάδα Γ.

## Συλλογή κλινικών πληροφοριών/μετρήσεων.

Για τη συλλογή κλινικών πληροφοριών, όπως το οικογενειακό και ατομικό αναμνηστικό, η ηλικία διάγνωσης ΣΔτ2, η καταγωγή αλλά και η λήψη φαρμακευτικής αγωγής, χρησιμοποιήθηκαν ιατρικοί φάκελοι των ασθενών και η μορφή συνέντευξης για την ομάδα ελέγχου. Η καταγραφή σωματομετρικών παραμέτρων έγινε με ελαφριά ένδυση και χωρίς παπούτσια. Μετρήθηκε το βάρος σώματος και το ύψος με τη χρήση ζυγαριάς ακριβείας και υψομέτρου. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος ως ο λόγος βάρους σώματος σε κιλά διά το ύψος σε μέτρα στον κύβο, ενώ μετρήθηκε και η περίμετρος μέσης. Για την πιστοποίηση της απουσίας ή παρουσίας ΣΔτ2 μετρήθηκαν τα επίπεδα ΓΝ και HbA1c μετά από ολονύκτια νηστεία. Για τον προσδιορισμό της HbA1c χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ευκρίνειας. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη παρείχαν γραπτό έντυπο συγκατάθεσης πριν από οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του ΑΠΘ.

**Επιλογή πολυμορφισμών (SNPs) και γονοτύπηση.** Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των πολυμορφισμών των γονιδίων *PPARA*, *PPARD*, *CLOCK/TMEM165*, *PER1*, *PER2* και *PER3* σε Έλληνες ασθενείς με ΣΔτ2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (μελέτη ασθενών-μαρτύρων). Απομονώθηκε γενετικό υλικό από ολικό αίμα και η γονοτύπηση έγινε με τη μέθοδο της αναγνώρισης αλληλουχιών (sequencing) με τη χρήση του Illumina Infinium PsychArray. Μετά από τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων για κάθε SNP και τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων για την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης αλλά και γενετικής συσχέτισης, επιλέχθηκαν οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στην ευρύτερη περιοχή ( $\pm 20\text{kb}$ ) που εδράζουν τα υποψήφια γονίδια. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά πακέτα PLINK και EIGENSOFT.<sup>18</sup>

**Στατιστική ανάλυση.** Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση των στατιστικών πακέτων PLINK και SPSS. Για τις διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά εφαρμόστηκε το Student's t-test και One-Way ANOVA με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 21.0. Ο λόγος πιθανοτήτων (ORs) για επικρατές και υπολειπόμενο αλληλόμορφο και η συσχέτιση με τον ΣΔτ2 έγινε με ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) μέσω του PLINK.<sup>19,20</sup> Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν περαιτέρω για τη σημαντικότητά τους, μετά από διόρθωση για πολλαπλές μεταβλητές. Αν και η διόρθωση κατά Bonferroni είναι η αρχική προσέγγιση στις περισσότερες μελέτες, δεν συμβαίνει το ίδιο και με τις γενετικές μελέτες. Σε αυτή την περίπτωση, η διόρθωση

κατά Bonferroni φαίνεται να είναι αρκετά συντηρητική καθώς δεν λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι τα SNPs μέσα σε ένα γονίδιο συχνά σχετίζονται μεταξύ τους.<sup>21</sup> Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία με τη μέθοδο της μετάθεσης (permutation test analysis), όπου υπολογιστικά με τη βοήθεια του PLINK «μετατίθενται» οι φαινότυποι του πληθυσμού και υπολογίζονται νέες τιμές  $p$  ( $p_{perm}$ ).<sup>19,22</sup> Η ανάλυση μετάθεσης είναι κατάλληλη για διόρθωση για πολλαπλές μεταβλητές σε μελέτες γονιδίων που γειτνιάζουν.<sup>23</sup> Οι τιμές  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## Αποτελέσματα

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από 716 ασθενείς με ΣΔτ2 (ομάδα Α) και 569 συμμετέχοντες στην ομάδα ελέγχου Β, εκ των οποίων οι 393 σχημάτισαν την ομάδα Γ. Υπήρξε σαφής υπεροχή των γυναικών σε όλες τις ομάδες με 52% γυναίκες έναντι 48% άνδρες στην ομάδα Α, 62% γυναίκες έναντι 38% στην ομάδα Β και 60% γυναίκες έναντι 40% άνδρες στην ομάδα Γ. Η μέση χρονική διάρκεια του ΣΔτ2 ήταν  $14,39 \pm 9,29$  έτη. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε βάρος σώματος, ΔΜΣ, περίμετρο μέσης, γλυκόζη νηστείας και HbA1c (όλα  $p < 0,05$ ) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών. Οι ασθενείς με ΣΔτ2 ήταν παχύσαρκοι με μέση τιμή ΔΜΣ  $31,57 \pm 5,43 \text{ kg/m}^2$ , ενώ οι συμμετέχοντες στην ομάδα ελέγχου Β ήταν υπέρβαροι με μέση τιμή ΔΜΣ  $29,82 \pm 5,32 \text{ kg/m}^2$ . Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Με τη δοκι-

**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης.

	ΣΔτ2 – Ομάδα Α	Ομάδα ελέγχου Β	Ομάδα ελέγχου Γ
Ηλικία (έτη)	68,93 $\pm$ 9,53	73,46 $\pm$ 7,254	74,00 $\pm$ 11,00
Φύλο (Γυναίκες: Άνδρες)	48%: 52%	38%: 62%	39,9%: 60,1%
Βάρος (kg)	84,94 $\pm$ 16,856	79 $\pm$ 17	78,00 $\pm$ 18,00
ΔΜΣ (kg/m <sup>2</sup> )	31,57 $\pm$ 5,437	29,82 $\pm$ 5,320	28,99 $\pm$ 6,26
Περίμετρος μέσης (εκ.)	104,62 $\pm$ 15,031	102,02 $\pm$ 11,883	100,59 $\pm$ 11,724
HbA1c (%)	7,29 $\pm$ 1,274	5,34 $\pm$ 0,562	5,20 $\pm$ 0,80
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	153,15 $\pm$ 53,71	100,04 $\pm$ 13,51	96,36 $\pm$ 3,65
Διάρκεια ΣΔτ2 (έτη)	14,39 $\pm$ 9,299	-	-
N	716	569	393

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανάλυσης μετάθεσης μεταξύ ομάδων Α και Β.

Γονίδιο	SNP	Υπολειπόμενο	Επικρατές	Pperm	MAF	OR	Κάτω 95	Άνω 95
<i>PPARA</i>	rs41329344	T	C	0,03746	0,1142	0,7781	0,6059	0,9994
	rs9626814	A	G	0,03746	0,1142	0,7781	0,6059	0,9994
	rs41355347	A	G	0,03746	0,1142	0,7781	0,6059	0,9994
	rs78864133	T	C	0,03746	0,1142	0,7781	0,6059	0,9994
	rs41378347	A	G	0,03082	0,1151	0,7679	0,5983	0,9857
	rs11704508	G	A	0,03111	0,116	0,7730	0,6019	0,9926
	rs41371446	C	T	0,03264	0,1147	0,7749	0,6033	0,9954
	rs45528736	G	A	0,03325	0,1154	0,7704	0,6	0,9893
	rs4253772	T	C	0,03397	0,1146	0,7723	0,6015	0,9916
	rs45552534	A	G	0,03397	0,1146	0,7723	0,6015	0,9916
	rs79700435	A	G	0,03397	0,1146	0,7723	0,6015	0,9916
	rs45576140	G	C	0,03397	0,1146	0,7723	0,6015	0,9916
	rs148478205	T	C	0,04702	0,00409	0,2384	0,05051	1,125
rs45576734	G	A	0,03462	0,1144	0,7765	0,6046	0,9974	
<i>PPARD</i>	rs9658167	A	G	0,02160	0,03399	0,5918	0,3776	0,9275
<i>PKDREJ</i>	rs6008384	C	T	0,03650	0,1392	0,7981	0,6342	1,004
	rs7291444	G	T	0,03181	0,1375	0,7843	0,6225	0,9881
	rs6519993	G	A	0,03945	0,1395	0,7979	0,6341	1,004
	rs36125344	C	G	0,04319	0,09869	0,7585	0,5806	0,9909
<i>UTS2</i>	rs2859389	T	C	0,04610	0,3403	0,8454	0,715	0,9996
<i>CLOCK/TMEM165</i>	rs1801260	C	T	0,03649	0,2998	0,8324	0,6999	0,9899

μασία της μεθόδου μετάθεσης διενεργήθηκαν δύο ξεχωριστές αναλύσεις.

Η πρώτη, ανάμεσα στις ομάδες Α και Β, επέτρεψε συγκρίσεις μεταξύ υπολειπόμενων και επικρατούντων αλληλομόρφων των υπό μελέτη γονιδίων και ανέδειξε συνολικά 14 πολυμορφισμούς στο γονίδιο *PPARA* με πιθανή προστατευτική δράση. Εκπρόσωπος αυτής της ομάδας είναι ο πολυμορφισμός rs41378347. Οι πολυμορφισμοί rs7291444\_G/T ( $p=0,031$ , OR=0,7843), rs36125344\_C/G ( $p=0,043$ , OR=0,758) και rs6008384\_C/T ( $p=0,036$ , OR=0,798) στο γονίδιο *PKDREJ* ενδεχομένως να προστατεύουν από τον ΣΔτ2. Ακόμη, ο πολυμορφισμός rs2859389 στο γονίδιο *UTS2* φαίνεται να προστατεύει από τον ΣΔτ2 ( $p=0,046$ , OR=0,8454). Πιθανή προστασία από τη νόσο ίσως να παρέχει και ο πολυμορφισμός rs9658167 ( $p=0,022$ , OR=0,5918) στο γονίδιο *PPARD* και ο πολυμορφισμός rs1801260 ( $p=0,036$ , OR=

0,832) στο γονίδιο *CLOCK/TMEM165*. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά στον Πίνακα 2. Ενδιαφέρον προκαλεί ο πολυμορφισμός rs6744132\_A/G, που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *HES6* και *PER2* και σχετίζεται θετικά με τη νόσο ( $p=0,044$ , OR=1,183), όπως προκύπτει από την πρώτη ανάλυση.

Στη δεύτερη ανάλυση που ακολούθησε, έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων μεταξύ των ομάδων Α και Γ. Στη δεύτερη αυτή σύγκριση εξαιρέθηκε η παρουσία προδιαβήτη από τον πληθυσμό. Από την ανάλυση αυτή αναδείχθηκαν και νέοι πολυμορφισμοί, όπως ο πολυμορφισμός rs2278637\_G/T ( $p=0,015$ , OR=0,784) στο γονίδιο *VAMP2* και ο πολυμορφισμός rs11943456\_T/C ( $p=0,017$ , OR=0,787) στο γονίδιο *CLOCK/TMEM165*. Από τους συνολικά τέσσερις πολυμορφισμούς που είχαν δείξει προστατευτική δράση στην πρώτη ανάλυση αναφορικά με το

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα ανάλυσης μετάθεσης μεταξύ ομάδων Α και Γ.

Γονίδιο	SNP	Υπολειπόμενο	Επικρατές	Pperm	MAF	OR	Κάτω 95	Άνω 95
<i>PKDREJ</i>	rs6008384	C	T	0,0444	0,137	0,778	0,5982	1,02
	rs7291444	G	T	0,03384	0,1352	0,7622	0,5856	0,992
	rs36125344	C	G	0,04498	0,09653	0,7393	0,5455	1,002
<i>UTS2</i>	rs2859389	T	C	0,04934	0,3361	0,8402	0,6922	1,02
<i>CLOCK/</i> <i>TMEM165</i>	rs11943456	T	C	0,017	0,4719	0,7876	0,655	0,9472
<i>UTS2</i>	rs2278637	G	T	0,015	0,3872	0,7844	0,6499	0,9466

γονίδιο *PKDREJ*, μόνο οι τρεις από αυτούς έφτασαν το όριο της σημαντικότητας στη δεύτερη ανάλυση, ενώ επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση με τον πολυμορφισμό rs2859389 για το γονίδιο *UTS2*, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3. Από τη δεύτερη αυτή ανάλυση δεν αναδεικνύεται κάποιος σημαντικός πολυμορφισμός για τα γονίδια *PPARA* και *PPARD*.

## Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί εάν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *CLOCK* σχετίζονται με την παρουσία ΣΔτ2. Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, αυτή φαίνεται να είναι η πρώτη εκτενής μελέτη για τα συγκεκριμένα γονίδια και τον ΣΔτ2 σε ελληνικό πληθυσμό. Οι ασθενείς, όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν παχύσαρκοι, σε αντίθεση με τον υπέρβαρο πληθυσμό στην ομάδα ελέγχου (ομάδα Β και Γ). Επιπλέον, είναι σαφές ότι η ομάδα ελέγχου είναι ηλικιακά μεγαλύτερη από την ομάδα των ασθενών, ως αποτέλεσμα του αρχικού σχεδιασμού της μελέτης. Η εφαρμογή της δοκιμασίας με τη μέθοδο της μετάθεσης, επέτρεψε τον υπολογισμό νέων, εμπειρικών, όπως ονομάζονται, τιμών p που ανέδειξαν μια πιθανή συσχέτιση των γονιδίων *PPARA*, *PPARD*, *PKDRJ*, *UTS2*, *CLOCK/TMEM165* και *VAMP2* με τον ΣΔτ2. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα φαίνεται να παρουσιάζουν μια προστατευτική δράση στην εμφάνιση ΣΔτ2. Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών που εντοπίστηκαν στο σύνολο των γονιδίων που μελετήθηκαν ανήκει είτε σε εσώνια, είτε σε κωδικοποιούσες περιοχές, η έκφραση των οποίων δεν φαίνεται να επιδρά άμεσα στην τελικά παραγόμενη πρωτεΐνη. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι δεν υπάρχει κάποιος σαφής

μηχανισμός που να εξηγεί επαρκώς την προστατευτική δράση των γονιδίων *CLOCK* στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ΣΔτ2. Ο πολυμορφισμός rs1801260 του γονιδίου *CLOCK/TMEM165* έχει συσχετιστεί με αυξημένη επίπτωση ΣΔτ2 σε Ιάπωνες με φυσιολογικό βάρος σώματος.<sup>24</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι πολυμορφισμοί του ίδιου γονιδίου φαίνεται να προστατεύουν από την εμφάνιση παχυσαρκίας και έμμεσα να συνδέουν τον κικράδιο ρυθμό με την ενεργειακή ομοιόσταση.<sup>10</sup> Μάλιστα, στην περίπτωση του ΣΔτ2, η δυσλειτουργία του κεντρικού βηματοδότη στον υποθάλαμο ήταν αυτή που είχε αρχικά συσχετιστεί με τη νόσο. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση ότι η δυσλειτουργία ενός ενδοκρινούς παγκρεατικού «ρολογιού» διαδραματίζει κεντρικότερο ρόλο στην εμφάνιση ΣΔτ2.<sup>25</sup> Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *PPARA* και ειδικότερα ο πολυμορφισμός rs79700435 έχει συσχετιστεί με την προδιάθεση για εκδήλωση υπερχοληστερολαιμίας,<sup>26</sup> ενώ ο πολυμορφισμός rs7291444 του γονιδίου *PKDREJ* έχει συσχετιστεί με την παρουσία αυξημένης ενδοφθάλμιας πίεσης και γλαυκώματος.<sup>27</sup> Από την προστατευτική δράση που αναδεικνύεται στη μελέτη, εξαιρείται ο πολυμορφισμός rs6744132\_A/G, που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *HES6* και *PER2* και σχετίζεται θετικά με τη νόσο. Συγκεκριμένα, τα άτομα με AA γονότυπο φαίνεται να κινδυνεύουν κατά 1,18 φορές περισσότερο να νοσήσουν από ΣΔτ2. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν ανήκει σε κάποιο γονίδιο και επομένως μπορεί μόνο έμμεσα να έχει κάποια βιολογική δράση. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παραλλαγές του γονιδίου *PER2* έχουν συσχετιστεί με υψηλές τιμές γλυκόζης νηστείας αλλά και κοιλιακή παχυσαρκία.<sup>25,28,29</sup>

**Περιορισμοί-Μειονεκτήματα.** Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά μιας πιθανής συσχέτισης των γονιδίων των κιρκάδιων ρυθμών με τον ΣΔτ2, αν και η μελέτη υπόκειται σε μια σειρά περιορισμών, με πρώτο αυτόν του μεγέθους δείγματος. Μια μελέτη με μεγαλύτερη δύναμη θα ήταν ιδανική. Πρόκειται για μελέτη ασθενών-μαρτύρων όπου η δειγματοληψία της ομάδας ελέγχου περιορίζεται σε λίγες χρονικές στιγμές. Για τον λόγο αυτό, η ηλικία της ομάδας ελέγχου ήταν αυστηρά περιορισμένη και μάλιστα σε ηλικιωμένους ασθενείς, σε μια προσπάθεια να αποκλειστούν μελλοντικές περιπτώσεις ΣΔτ2 που σε νεαρότερη ηλικία δεν θα είχαν ακόμα εμφανιστεί. Αυτός ο περιορισμός, ωστόσο, είναι πιθανό να επέτρεψε την αναγνώριση προστατευτικών γονιδίων. Ακόμη, η χρήση των τιμών ΓΝ και HbA1c συγκριτικά με τη ΓΝ μόνο, είναι ένα από τα πλεονεκτήματα της μελέτης. Αξίζει να σημειωθεί ως περιορισμός της μελέτης και η απουσία δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη, ως μέσο διάγνωσης του ΣΔτ2.

Συμπερασματικά, τα γονίδια *CLOCK* ενδεχομένως να διαδραματίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΣΔτ2 μέσω της απορρύθμισης του κιρκάδιου βηματοδότη που έχει με τη σειρά του επιβλαβείς επιπτώσεις στον μεταβολισμό της γλυκόζης, αλλά και στο σωματικό βάρος. Σε αυτή τη μελέτη συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων, προκύπτουν μεταλλάξεις των υποψηφίων γονιδίων που φαίνεται να παρέχουν μια σχετική προστασία από μια μελλοντική εμφάνιση ΣΔτ2, ενώ περιγράφεται μία *de novo* συσχέτιση πολυμορφισμού με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Η παρουσία πληθώρας αποτελεσμάτων, αλλά η απουσία τεκμηριωμένης πρωτεϊνικής μεταβολής, αντανακλούν την πολυπλοκότητα της παθογένειας του ΣΔτ2, αλλά και την ανάγκη διενέργειας μελετών σε ζωικά μοντέλα με σκοπό την εκτενέστερη μελέτη του παγκρεατικού «ρολογιού» και τη σχέση του με νοσήματα του μεταβολισμού, όπως ο ΣΔτ2.

## Abstract

*Tsekmekidou X, Koufakis T, Tsetsos F, Georgitsi M, Theodoridis M, Papanas N, Paschou P, Kotsa K. Variants in CLOCK genes could be associated with lower risk of type 2 diabetes in an elderly Greek population Hellenic Diabetol Chron 2021; 1: 19-26.*

**Introduction:** Recent evidence have linked circadian rhythm dysregulation to increased risk of metabolic

disorders. This study aims to explore a potential association between variation in genes regulating the endogenous circadian timing system (clock genes) and risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in a sample of Greek elderly people.

**Material and Methods:** Variants within *PPARA*, *PPARD*, *CLOCK/TMEM165*, *PER1*, *PER2* and *PER3* genes were genotyped in 716 individuals with T2D (A) and 569 normoglycemic controls (B) and allele frequencies were compared between the groups in a case control study design. Samples were genotyped on Illumina Human PsychArray. Permutation test analysis was implemented to determine statistical significance. To outweigh the possibility of the presence of subjects with prediabetes, controls with HbA1c <5.7% and fasting glucose <100 mg/dl comprised group C (n=393) and a separate analysis was performed.

**Results:** A protective role against T2D was identified for 14 variants in the *PPARA* gene. Rs7291444, rs36125344, rs6008384 in *PKDREJ* and rs2859389 in *UTS2* demonstrated a protective role against T2D in both analyses. In contrast, rs6744132, located between *HES6* and *PER2*, was positively correlated with T2D risk. Only in the secondary analysis, rs2278637\_G/T in *VAMP2* and rs11943456 in *CLOCK/TMEM165* were found to confer protection against T2D. In a recessive model analysis in between all groups *PPARD* variants exhibit a protective role against disease.

**Conclusions:** Our findings suggest a possible implication of clock genes in T2D susceptibility. Further mechanistic studies are needed to clarify the mechanisms that connect circadian rhythm dysfunction and T2DM pathogenesis.

## Βιβλιογραφία

1. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Continuum (Minneapolis)* 2013; 19(1 Sleep Disorders): 132-47.
2. Ramkisoensing A, Meijer JH. Synchronization of biological clock neurons by light and peripheral feedback systems promotes circadian rhythms and health. *Front Neurol* 2015; 6: 128.
3. Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 2010; 90: 1063-102.
4. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 2014; 383: 1068-83.
5. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: 2011-30.

6. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157.
7. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet (London, England)* 2010; 375: 2215-22.
8. Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 2010; 330: 1349-54.
9. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4453-8.
10. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 658-62.
11. Woon PY, Kaisaki PJ, Bragança J, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 14412-7.
12. Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, et al. TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 15-26.
13. Chen L, Yang G. PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. *PPAR Res* 2014; 2014: 653017.
14. Archer SN, Schmidt C, Vandewalle G, et al. Phenotyping of PER3 variants reveals widespread effects on circadian preference, sleep regulation, and health. *Sleep Med Rev* 2018; 40: 109-26.
15. Harfmann BD, Schroder EA, Esser KA. Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *J Biol Rhythms* 2015; 30: 84-94.
16. Blonde L, Bloomgarden ZT, Bray GA, et al. American Association of Clinical Endocrinologists / American College of Endocrinology statement on the use of hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes. *Endocr Pract* 2010; 16: 155-6.
17. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2013. *Diabetes Care* 2013; 36(Suppl.1): S11-S66.
18. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 904-9.
19. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559.
20. Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, et al. Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 2015; 4: 1-16.
21. Salyakina D, Seaman SR, Browning BL, et al. Evaluation of Nyholt's procedure for multiple testing correction. *Hum Hered* 2005; 60: 19-25.
22. Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 1994; 138: 963-71.
23. Hendricks AE, Dupuis J, Logue MW, et al. Correction for multiple testing in a gene region. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 414-8.
24. Uemura H, Katsuura-Kamano S, Yamaguchi M, et al. Variant of the clock circadian regulator (CLOCK) gene and related haplotypes are associated with the prevalence of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Diabetes* 2016; 8: 667-76.
25. Gale JE, Cox HI, Qian J, et al. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *J Biol Rhythms* 2011; 26: 423-33.
26. Paththinige CS, Sirisena ND, Dissanayake VHW. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis* 2017; 16: 103.
27. Chen F, Klein AP, Klein BEK, et al. Exome array analysis identifies CAV1/CAV2 as a susceptibility locus for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 544-51.
28. Englund A, Kovanen L, Saarikoski ST, et al. NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *J Circadian Rhythms* 2009; 7: 1-9.
29. Garaulet M, Corbalán-Tutau MD, Madrid JA, et al. PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psychobehavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity. *J Am Diet Assoc* 2010; 110: 917-21.

**Λέξεις-κλειδιά:**

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2  
γονίδια CLOCK  
καρδιάς ρυθμός  
ηλικιωμένοι  
Έλληνες  
Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός

**Key words:**

type 2 diabetes mellitus  
CLOCK genes  
circadian rhythm  
elderly  
Greek  
Single Nucleotide Polymorphism