

## Участие мутантных генов в патогенезе острого идиопатического панкреатита

Ю.С.ВИННИК, О.В.ПЕРВОВА, Д.В.ЧЕРДАНЦЕВ, Н.М.ТИТОВА

### Participation of mutant genes in the pathogenesis of the idiopathic pancreatitis

Yu.S. VINNIK, O.V. PERVOVA, D.V. CHERDANCEV, N.M. TITOVA

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого  
Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

Проведен анализ распределения полиморфных вариантов генов катионного трипсиногена (PRSS1), ингибитора трипсина (SPINK1), регулятора муковисцидоза (CFTR), генов глутатион-S-трансфераз M1 (GSTM1) и T1 (GSTT1) в группе больных острым идиопатическим панкреатитом (32 пациента) в сравнении с группой здоровых доноров (69 человек). В популяции г. Красноярска полиморфные варианты гена GSTM1 зафиксированы у 31,25% больных острым панкреатитом и у 9,4% больных панкреонекрозом. Деструктивная форма диагностирована у 28,1% пациентов. У пациентов с идиопатическим панкреатитом риск развития тяжелой формы заболевания в 33,3% случаев обусловлен изолированными мутациями гена ингибитора трипсина. Мутации гена катионного трипсиногена в сочетании с полиморфными вариантами генов SPINK1, GSTM1, CFTR являются летальными генетическими детерминантами, определяющими неблагоприятное течение деструктивного процесса.

*Ключевые слова: острый панкреатит, патогенез, гены, мутации*

The analysis of distribution of polymorphic variants of the genes of the cationic trypsinogen (PRSS1), inhibitor of trypsin (SPINK1), regulator of the cystic fibrosis (CFTR) and genes of glutathione-S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) is carried out. This research was held according to the group of people, who have the disease of idiopathic pancreatitis (32 people). This group of people was compared with the donors (69 people). The gene mutation exists under the condition of the appearing of the acute idiopathic pancreatitis. In Krasnoyarsk 31,25% patients, who have the acute pancreatitis and 9,4% of patients with pancreonecrosis have polymorphic variants of the gene GSTM1. The destructive form of the pancreatitis is diagnosed for 28,1% of patients. Patients with idiopathic pancreatitis have the risk of development of the heavy form of the disease in 33,3% of cases is caused by the isolated mutations of a gene inhibitor of trypsin. The mutations of the gene of cation trypsinogen in a combination with the polymorphic variants of genes SPINK1, GSTM1, CFTR are lethal genetic determinants defining an adverse current of the destructive process.

*Key words: acute pancreatitis, pathogenesis, genes, mutations*

Острый панкреатит (ОП) был и остается одной из нерешенных проблем абдоминальной хирургии. По нашим данным, при деструктивных формах ОП ведущее значение в этиопатогенезе заболевания принадлежит употреблению алкоголя и его суррогатов, второе место по распространенности занимает идиопатический панкреатит (ИП), который варьирует в пределах от 18 до 22%, желчнокаменная болезнь является причиной ОП в 15-18% случаев.

Одно из современных направлений изучения ОП – исследование факторов генетической предрасположенности к тяжелым формам заболевания [3, 5, 8]. К настоящему моменту идентифицирован ряд мутаций, которые рассматриваются как основные факторы наследственной предрасположенности к ОП. Известно, что ген, кодирующий катионный трипсиноген (PRSS1), обеспечивает необходимое для пищеварительного процесса количество активного трипсина [9, 15, 16, 19]. Мутация R122H в этом гене может вызывать неконтролируемое усиление активации протеаз в поджелудочной железе (ПЖ), приводя к ОП [1, 6, 8, 10, 17,

18, 20]. Мутации в гене панкреатического ингибитора трипсина (SPINK1) нарушают инактивацию трипсина в ткани ПЖ, что приводит к активации панкреатических ферментов, некрозу ткани ПЖ и лизису стенок венул [11, 12]. Мутации в гене трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR), кодирующем регуляцию трансмембранного проведения, реализуются на клеточном уровне недостаточной гидратацией, защелачиванием первичного секрета экзокринных желез и увеличением его вязкости, вследствие чего нарушается эвакуация панкреатического секрета [2, 4, 7, 13, 14].

Цель исследования: разработать методологию определения риска развития тяжелого ИП на основании идентификации мутаций генов, задействованных в его патогенезе.

#### Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, кафедре биохимии и физиологии человека и животных

Сибирского федерального университета. Для исследования генетической предрасположенности к ОП обследовано 69 здоровых доноров (группа сравнения); исследуемую группу составили 32 пациента с ИП. На момент поступления состояние всех больных соответствовало средней степени тяжести.

Молекулярно-генетический анализ осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на программируемом амплификаторе «Mastercyclergradient» («Eppendorf», Germany). В качестве генов «предрасположенности» выбрана диагностическая панель из 5 генов, по данным литературы, ассоциированных с развитием ОП. Детекцию полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* проводили методом Иващенко (2001). Мутацию R122H в гене *PRSS1* и мутацию N34S в гене *SPINK1* определяли с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа с рестрикторами *Bst*FN1 («Сибэнзим») и *Tsp*R1 («New England BioLab»), соответственно. Анализ мутаций гена *CFTR* осуществляли с помощью диагностического набора «CF8» («ДНК-лаборатория») на 8 наиболее распространенных мутаций (del21 kb, ΔF508, ΔI507, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 3821 delT). Визуализацию результатов проводили электрофоретически в 3% агарозном геле (для генов глутатион-S-трансферазы, *PRSS1* и *SPINK1*) и в 7% полиакриламидном геле для гена *CFTR* с окраской бромистым этидием.

Расчет аллелей и генотипов выполняли по уравнению Харди-Вайнеберга. В качестве критерия – является ли изучаемый признак фактором риска заболевания – использовали отношение шансов.

### Результаты и их обсуждение

Генетическое картирование, проведенное в группе больных ИП, выявило следующую закономерность. Из 32 больных этой группы деструктивная форма заболевания зарегистрирована у 9, что составило 28,1%. Среди больных деструктивным панкреатитом у 77,8% (7 больных) были выявлены мутации генов, непосредственно участвующих в регуляции ферментативной функции ПЖ. У больных с отеочной формой ИП ни одной мутации генов *SPINK1*, *CFTR* и *PRSS1* обнаружено не было.

В результате исследования полиморфного варианта гена ингибитора трипсина среди больных ОП, мутантный аллель был зафиксирован у 4 больных, что составило 12,5%. 3 больных являлись гетерозиготными, так как у них только один аллель содержал замену N34S и один пациент оказался гомозиготным в отношении такой мутации. Учитывая, что среди здоровых обследованных не было выявлено ни одного случая полиморфизма гена *SPINK1*, участвующего в инактивации внутрипанкреатического активного трипсина, можно предположить, что обнаруженная мутация N34S гена *SPINK1* является одним из предрасполагающих факторов развития ИП (рис. 1).

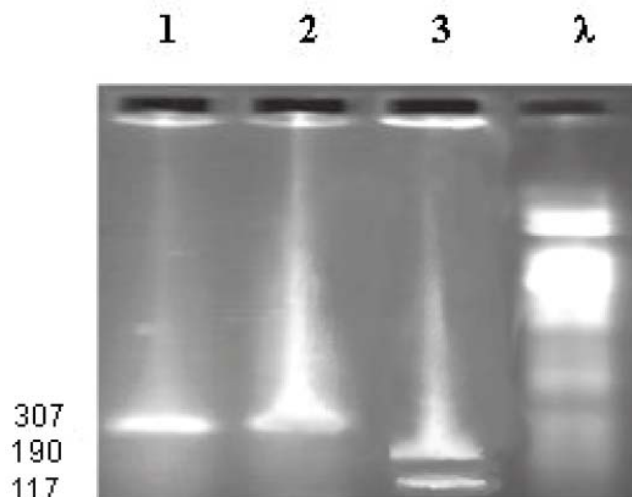


Рис. 1. Электрофореграмма амплификации *SPINK1* гена: 1, 2 - отсутствие мутаций; 3 - мутация N34S; 4 - ДНК фага λ.

Проведенный анализ клинического течения ОП показал, что у больных с генетически детерминированной слабостью механизма ингибирования трипсина патологический процесс практически во всех случаях сопровождается развитием деструкции ПЖ. У трех больных ОП с мутантным аллелем гена *SPINK1* наблюдалось субтотальное поражение ПЖ. У пациента, гомозиготного в отношении мутации гена *SPINK1* зона деструкции ПЖ была тотальной с обширным поражением забрюшинной клетчатки. Кроме того, у больных ОП, детерминированного мутацией гена *SPINK1*, формирование зон некроза ПЖ происходит в сравнительно короткие сроки с быстрым прогрессированием объема девитализированных тканей.

В ранние сроки после госпитализации умер 1 больной, содержащий N34S замену в двух аллелях гена ингибитора трипсина и R122H мутацию в гене катионного трипсиногена. По-видимому, сочетание нескольких мутантных генов увеличивает не только риск возникновения деструктивного панкреатита, но и тяжесть патологического процесса. Поэтому выявление в генотипе больного мутаций нескольких генов, участвующих в функционировании клеток ПЖ, можно рассматривать как «летальный» вариант панкреонекроза.

Анализ полиморфизма гена катионного трипсиногена в группе больных ИП показал наличие мутации R122H у 4 больных, причем у всех больных выявленные мутации гена *PRSS1* были амплифицированы только в одном аллеле. Частота встречаемости данной мутации в группе составила 12,5%. Наличие мутантного аллеля гена *PRSS1* сопровождалось развитием деструктивного панкреатита у 100% больных. При этом мутации гена *PRSS1* во всех случаях были сочетанными: у 2 пациентов дополнительно были выявлены мутации гена глутатион-S-трансферазы M1, еще у 2 – замена N34S гена *SPINK1* и delF508 гена регуля-

**Распределение частот генотипов и аллелей генов *GSTM1* у здоровых доноров и больных идиопатическим ОП г. Красноярск**

Ген	Характеристика группы	Частота аллелей (%)		Частота генотипов (%)		
		+	0	+/+	+/0	0/0
GSTM1	Здоровые доноры	54,9	45,1	30,1	49,6	20,3
	Больные идиопатическим ОП	75	25	59,4	31,2	9,4

Примечания: «+» - нормальный аллель гена; «0» - делеционный («нулевой») аллель гена.

тора трансмембранного муковисцидоза. При анализе особенностей клинического течения ОП, детерминированного полиморфным вариантом гена катионного трипсиногена, были выявлены те же тенденции, что и при ОП, связанном с мутацией гена ингибитора трипсина. 2 больных панкреонекрозом, имевших сочетанные мутации R122H гена PRSS1 + гомозиготная мутация N34S гена SPINK1 и полиморфный вариант гена катионного трипсиногена в комбинации с мажорной мутацией delF508 гена CFTR умерли в течение первых 3-х суток с момента госпитализации.

Частота встречаемости мутации delF508 гена трансмембранного регулятора муковисцидоза в исследуемой группе составила 3,12% и зафиксирована лишь у 1 больного. Такая мутация, согласно проведенным исследованиям, обладает достаточно низкой степенью распространенности среди жителей г. Красноярск. В группе больных ИП гетерозиготная мутация delF508 гена трансмембранного регулятора муковисцидоза была выявлена у пациента с тотальным поражением ПЖ, содержащего также мутантный аллель гена катионного трипсиногена. Исследуемая мутация гена CFTR, согласно данным других исследователей, является одной из самых распространенных и тяжелых для данного гена, что послужило основанием называть ее «мажорной». Однако связь ее с развитием ОП на территории исследуемого региона прослеживается лишь в единичных случаях. Вероятно, патогенетическое значение мутации delF508 для идиопатического ОП проявляется в сочетании с полиморфными вариантами других генов.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1* и *GSTT1* в группе больных ИП и у здоровых выявил следующие закономерности (табл. 1).

Среди больных ИП гомозиготный делеционный вариант гена *GSTM1* был выявлен у 9,4% пациентов, что более чем в 2 раза реже по сравнению с частотой встречаемости этой протяженной делеции, среди соматически здоровых обследованных. Величина OR для гена *GSTM1* составила 0,4, что свидетельствует об отсутствии взаимосвязи полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы M1 с развитием идиопатического ОП. При исследовании распределения частот полиморфного варианта гена *GSTT1* и генотипа *GSTT1* 0/0 среди здоровых лиц и исследуемой группой, мутантные аллели были обнаружены только у 3 больных, что составило 9,4%. Нулевой генотип был выявлен у одного

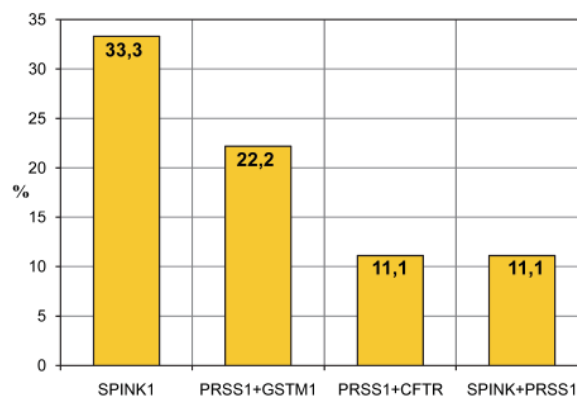


Рис. 2. Частота встречаемости мутаций генов у больных деструктивным идиопатическим панкреатитом.

больного, остальные 2 пациента являлись гетерозиготными. Анализ ассоциаций полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития ИП выявил следующие закономерности. Полиморфные варианты гена *GSTM1* были зафиксированы у 31,25% больных отечным панкреатитом и у 9,4% больных панкреонекрозом. Распределение частот делеций гена *GSTM1* среди больных отечным и деструктивным панкреатитом составило 3,1 и 6,25%, соответственно.

Итоговый клиничко-генетический анализ показал, что деструктивная форма острого ИП в 77,7% случаев детерминирована генетическим полиморфизмом (рис. 2).

У 33,3% больных выявлены изолированные мутации гена ингибитора трипсина, у 44,4% – обнаружены сочетанные мутации гена катионного трипсиногена с другими генами. В 2 случаях дополнительно выявлены делеции гена *GSTM1*, в 1 – мутация гена трансмембранного проведения и ингибитора трипсина. У всех этих больных диагностировано обширное поражение ПЖ и забрюшинной клетчатки.

## Вывод

У пациентов с ИП риск развития тяжелой формы заболевания в 33,3% случаев обусловлен изолированными мутациями гена ингибитора трипсина. Мутации гена катионного трипсиногена в сочетании с полиморфными вариантами генов *SPINK1*, *GSTM1*, *CFTR* являются летальными генетическими детерминантами, определяющими неблагоприятное течение деструктивного процесса, высокий уровень осложнений и летальности.

## Список литературы

1. Баранов А.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности» (введение в предродительную медицину) СПб.: Интермедика 2000; 271.
2. Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к некоторым частым мультифакториальным заболеваниям. Мед. генетика 2004; 3: 102-112.
3. Баранов В.С. Геномика и молекулярная медицина. Молекуляр. биология 2004; 1: 110-117.
4. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В. Ассоциация полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой. Генетика 2001; 1: 107-111.
5. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Петрова Н.В. Муковисцидоз: достижения и проблемы на современном этапе. Мед. генетика 2004; 9: 398-412.
6. Маев И.В. Наследственный панкреатит. Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии 2004; 1: 20-25.
7. Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Роль мутации гена катионического трипсиногена (PRSS1-гена) в патогенезе хронического панкреатита. Клинич. медицина 2004; 10: 12-16.
8. Маркова Е.В., Зотова Н.В., Титова Н.М. Наследование панкреатита: современные аспекты. Актуальные проблемы биологии, медицины, экологии 2004; 1-3: 49-51.
9. Маркова Е.В., Коноваленко А.Н., Титова Н.М. Генетико-биохимические особенности глутатион-S-трансферазы у больных острым панкреатитом. Эксперим. и клинич. гастроэнтерология 2004; 1: 113-114.
10. Шангареева З.А., Викторова Т.В., Насыров Х.М. Анализ полиморфизма генов, участвующих в метаболизме этанола, у лиц с алкогольной болезнью печени. Мед. генетика 2003; 11: 485-490.
11. Bernardino A.L.F., Guarita D.R., Carlos B.M. CFTR, PRSS1 and SPINK1 Mutations in the Development of Pancreatitis in Brazilian Patients. J. Pancreas 2003; 4: 5: 169-177.
12. Chen J.M., Piepoli A., Le Bodic L. Mutational screening of the cationic trypsinogen gene in a large cohort of subjects with idiopathic chronic pancreatitis. Clin. Genet 2001; 59: 189-193.
13. Chen J.M., Raguene O., Ferec C. CGC-to-CAT gene conversion-like event resulting in the R122H mutation in the cationic trypsinogen gene and its implication in the genotyping of pancreatitis. J. Med. Genet 2000; 37: 11: 36.
14. Gorry M.C., Gabbaiadeh D., Furey W. Multiple mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with hereditary pancreatitis. Gastroenterology 1997; 113: 1063-1068.
15. Kukor Z., Toth M., Pal G. Human cationic trypsinogen. Arg(117) is the reactive site of an inhibitory surface loop that controls spontaneous zymogen activation. J. Biol. Chem 2002; 277: 6111-6117.
16. Naruse S. Molecular pathophysiology of pancreatitis. Intern. Med 2003; 42: 3: 288-289.
17. Patuzzo C., Castellani C., Sagramoso C. Cationic trypsinogen and pancreatic secretory trypsin inhibitor gene mutations in neonatal hypertrypsinemia. Eur. J. Hum. Genetics 2003; 11: 1: 93-96.
18. Simon P., Weiss F.U., Sahin-Tóth M. Hereditary pancreatitis caused by a novel PRSS1 mutation (Arg-122 → Cys) that alters autoactivation and autodegradation of cationic trypsinogen. J. Biol. Chem 2002; 277: 5404-5410.
19. Teich N., Bauer N., Mössner J. Mutational screening of patients with nonalcoholic chronic pancreatitis: identification of further trypsinogen variants. Am. J. Gastroenterol 2002; 97: 341-346.
20. Truninger K., Ammann R.W., Bluma H.E., Witt H. Genetic aspects of chronic pancreatitis: insights into aetiopathogenesis and clinical implications. Swiss Med. Wkly 2001; 131: 565-574.

Поступила 12.02.2011 г.

## Информация об авторах

1. Винник Юрий Семенович – д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, заведующий кафедрой общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, e-mail: olga-pervova@mail.ru
2. Первова Ольга Владимировна – д.м.н., профессор кафедры общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, e-mail: olga-pervova@mail.ru
3. Черданцев Дмитрий Владимирович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней №1 с курсом сердечно-сосудистой хирургии им. профессора А.М.Дыхно Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, e-mail: olga-pervova@mail.ru
4. Титова Надежда Митрофановна – к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии животных тканей Сибирского Федерального университета, e-mail: olga-pervova@mail.ru