

УДК 616.37-002.1-092-07-085
DOI 10.11603/2414-4533.2016.1.5881

© В. В. МАКСИМ'ЮК

ВДНЗ "Буковинський державний медичний університет"

Поліморфізм N34S гена секреторного панкреатичного інгібітора трипсину (SPINK1) у хворих на різні форми гострого панкреатиту

V. V. MAKSYMUK

SHEI "Bukovynian State Medical University"

N34S GENE POLYMORPHISM PANCREATIC SECRETORY TRYPSIN INHIBITOR (SPINK1) IN PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF ACUTE PANCREATITIS

Вивчено частоту мутації N34S гена SPINK1 у хворих на гострий панкреатит. Встановлено, що серед хворих на різні форми гострого панкреатиту частіше зустрічається носійство сприятливого N-алеля, при меншій кількості патологічних SS-гомозигот. Розвиток набрякової та некротичної форми гострого панкреатиту не асоціюється з певним генотипом N34S поліморфізму гена SPINK1. Це свідчить про те, що носійство мутаційного S-алеля не асоціюється з розвитком гострого панкреатиту, тобто не є безпосереднім ініціюючим чинником його виникнення.

There was studied the frequency of the mutation N34S of SPINK1 gene in patients with acute pancreatitis. It was found out that among patients with different forms of acute pancreatitis is more common presents N-allele, with fewer pathological SS-homozygotes. The development of edematous and necrotizing forms of acute pancreatitis is not associated with a specific genotype of the N34S polymorphism of SPINK1 gene. This suggests that the accumulation of mutation S-alleles is not associated with development of acute pancreatitis; that is not a direct initiating factor for its occurrence.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Одним з основних генетично детермінованих механізмів, які можуть суттєво впливати на активність розвитку автокаталітичного процесу в підшлунковій залозі (ПЗ), є нейтралізуючий вплив секреторного панкреатичного інгібітора трипсину [1–5]. Вказаний пептид складається з 56 амінокислот і відіграє роль специфічного субстрату для трипсину, реалізуючи свій інгібуючий вплив шляхом утворення необоротного зв'язку між серином трипсину і лізином свого активного центру [1, 3, 5, 6, 7].

Ген SPINK1 локується на 5-й хромосомі. При цьому в результаті сучасних генетичних досліджень встановлено, що на третьому екзоні гена SPINK1 може зустрічатися мутація N34S, яка успадковується за аутомно-рецесивним типом [1, 2, 4, 5, 8–10]. Наявність такої трансцизії у носіїв двох патологічних S-алелів супроводжується неспроможністю одного з основних механізмів нейтралізації трипсину і може призводити до надмірної неконтрольованої внутрішньоацинарної активації цього фермента. Очевидно, що наявність наведеного генетично детермінованого патологічного механізму за умов гострого панкреатиту (ГП) може супроводжуватись потенціюванням автокаталітичного ураження тканин

ПЗ і, як наслідок, суттєво обтяжувати перебіг захворювання. Однак вказане питання на сьогодні залишається майже не вивченим.

Окрім того, аналіз літературних джерел щодо особливостей дистрибуції генотипічних варіантів N34S поліморфізму гена SPINK1 у хворих на ГП різних популяційних груп засвідчив суперечливі результати [1, 5, 7, 8]. Це можна пояснити етнічними особливостями розподілу генотипів в осіб різних популяцій та фрагментарністю отриманих даних, які потребують подальшого вивчення та більш чіткої систематизації.

Мета роботи: провести аналіз частоти поліморфізму N34S гена SPINK1 у жителів Чернівецької області, які хворіють на різні форми ГП, та вивчити можливі взаємозв'язки між різними видами генотипу та етіологічними чинниками захворювання.

Матеріали і методи. У дослідженні взяло участь 88 осіб із різними формами гострого панкреатиту, яким після підписання інформованої згоди пацієнта проводили генетичні дослідження. Серед них: 53 (60,23 %) чоловіки та 35 (39,77 %) жінок. Середній вік пацієнтів склав (49,46±1,53) року.

За морфологічними формами ГП хворих поділили на 2 групи: перша група – 27 осіб із гострим

набряковим панкреатитом, друга група – 61 особа із гострим некротичним панкреатитом. Окремо проводили додатковий розподіл пацієнтів за етіологічним чинником виникнення захворювання, виділяючи дві основні його форми: біліарний та небіліарний панкреатит. Основними критеріями такого розподілу служили наявність чи відсутність калькульозного холециститу та його ускладнень (холедохолітиаз, холангіт, механічна жовтяниця), внутрішньопротокової біліарної гіпертензії, гіпербілірубінемії.

Алелі поліморфних ділянок третього екзону гена SPINK1 вивчали шляхом постановки полімеразної ланцюгової реакції із застосуванням специфічних праймерів: sense 5'-CAATCACAGTTATTCACAGAG-3', antisense 5'-GTTTGCTTTTCTCGGGTGAG-3'. Для дискримінації алелів третього екзону гена SPINK1 використовували ендонуклеазу рестрикції *Pst*I.

Статистичну залежність між величинами для нормально розподілених вибірок перевіряли шляхом визначення критерію Фішера, χ^2 -критерію за Пірсоном, у т. ч. відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга.

Результати досліджень та їх обговорення.

Електрофореграма продуктів ампліфікації наведена на рисунку 1. Довжина ампліфікату N34S поліморфізму гена SPINK1 становила 320 пар нуклеотидів (пн). За наявності в 34 кодоні 3-го екзону нуклеотидної послідовності даного гена аденіну ампліфікат розщеплювався рестриктазою *Pst*I на фрагменти розмірами 320 і 286 пн. У випадку трансверсії А → G сайт для рестрикції *Pst*I втрачався.

Дистрибуції генотипів N34S поліморфізму гена SPINK1 у хворих на різні форми ГП наведено у таблиці 1. У більшості обстежуваних ви-

явили наявність сприятливого “дикого” N-алеля (“wild-type”, Wt) – 69,32 % (61) осіб, тоді як патологічний “мутантний” S-варіант ідентифікували у 30,68 % (27) випадках. При цьому гомозиготних носіїв “дикого” NN-генотипу (N34) було 42,05 % (37) осіб, NS-гетерозигот (N34S) – 54,55 % (48) випадків, 3 (3,40 %) пацієнти були гомозиготними носіями мутантного S-алеля (SS-генотип, 34S) (рис. 1). Розподіл генотипів за поліморфним варіантом N34S гена SPINK1 серед обстежених відповідав очікуваній рівновазі Харді-Вайнберга ($p > 0,05$).

При розподілі всіх пацієнтів за етіологічним чинником (табл. 1) виявили, що частота появи NN- та NS-генотипів у хворих на гострий біліарний панкреатит склала 53,85 % (21) та 46,15 % (18) відповідно і статистично не відрізнялась від такої у хворих на панкреатит небіліарного генезу – 32,65 % (16) та 61,23 % (30) відповідно ($\chi^2=0,003$, $p=0,95$ та $\chi^2=0,68$, $p=0,4$ відповідно).

У хворих на гострий набряковий панкреатит частота виявлення N34-генотипу складала 40,74 %

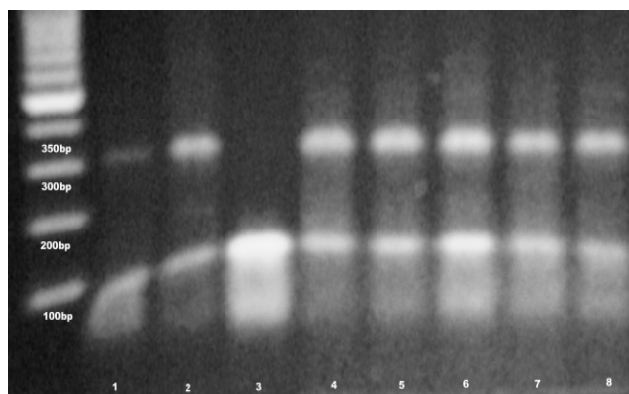


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації N34S поліморфізму гена SPINK1: 1–2, 4–8 – гетерозиготні носії NS-генотипу; 3 – гомозигота за мутаційним типом (S34S-генотип).

Таблиця 1. Фенотипічна характеристика хворих на різні форми гострого панкреатиту залежно від N34S поліморфізму гена SPINK1

Групи хворих	Генотипи N34S поліморфізму гена SPINK		
	N34, % (n)	N34S, % (n)	34S, (n)
Гострий панкреатит, n=88	42,05 (37)	54,55 % (48)	3,40 (3)
біліарний, n=39	53,85 (21)	46,15 % (18)	0
небіліарний, n=49	32,65 (16)	61,23 % (30)	6,12 (3)
Гострий набряковий панкреатит, n=27	40,74 (11)	59,26 % (16)	0
біліарний, n=15	60,00 (9)	40,00 % (6)	0
небіліарний, n=12	16,67 (2)	83,33 % (10)	0
Гострий некротичний панкреатит, n=61	42,62 (26)	52,46 % (32)	4,92 (3)
біліарний, n=24	50,00 (12)	50,00 % (12)	0
небіліарний, n=37	37,84 (14)	54,05 % (20)	8,11 (3)

(11) осіб, N34S-генотипу – 59,26 % осіб (16), а гомозиготних носіїв мутантного S-алеля у цій групі пацієнтів не виявили. При аналізі групи осіб із гострим набряковим біліарним панкреатитом встановили, що гомозиготні носії сприятливого “дикого” N-алеля та гетерозиготи зустрічались із частотою 60,00 % (9) та 40,00 % (6) відповідно. Натомість, у пацієнтів із набряковим ГП небіліарного генезу констатовано тенденцію до домінування NS-генотипу, порівняно з NN-генотипом, частота виявлення яких складала 83,33 % (10) та 16,67 % (2) відповідно. Проте такі відмінності не були вірогідними ($\chi^2=2,00$, $p=0,16$).

У хворих на гострий некротичний панкреатит частота виявлення N34-генотипу складала 42,62 % (26) осіб, N34S-генотипу – 52,46 % осіб (32), а мутаційного гомозиготного 34S-генотипу – 4,92 % (3) осіб. Водночас у пацієнтів з біліарним та небіліарним генезом захворювання частота виявлення генотипів NN- (N34) та NS- (N34S) істотно не відрізнялась: 50,00 % (12) та 50,00 % (12) проти 37,84 % (14) та 54,05 % (20) відповідно ($\chi^2=0,001$, $p=0,97$ та $\chi^2=0,114$, $p=0,74$ відповідно).

Гомозиготний мутаційний SS-генотип виявлено у трьох осіб вказаної групи. Крім того, у осіб з SS-генотипом ініціація ГП була пов’язана з небіліарним чинником, а його перебіг у всіх трьох хворих характеризувався розвитком поширеного гнійного панкреонекрозу та тяжких його місцевих і системних ускладнень. Враховуючи наведене, на нашу думку, у конкретних випадках однією з основних причин розвитку тяжкого клінічного перебігу ГП був його спадковий характер, тобто

наявність генетично детермінованих розладів інтрацелюлярної інактивації трипсину.

Висновки. 1. Частота зустрічальності N- і S-алелей N34S поліморфізму гена SPINK1 в обстежених хворих на різні форми гострого панкреатиту відповідає нормальному розподілу для значної більшості європеїдних популяцій із переважанням сприятливого “дикого” N-алеля.

2. Серед хворих на різні форми гострого панкреатиту частіше зустрічається носійство сприятливого N-алеля (42,05 і 54,55 %), при меншій кількості патологічних SS-гомозигот (3,40 %).

3. Небіліарна форма гострого набрякового панкреатиту невірогідно частіше зустрічається у носіїв мутантного S-алеля: 83,33 % (10) проти 16,67 % (2) осіб, $\chi^2=3,546$, $p=0,060$.

4. Розвиток набрякової та некротичної форми гострого панкреатиту як біліарного, так і небіліарного генезу не асоціюється з певним генотипом N34S поліморфізму гена SPINK1. Це свідчить про те, що носійство мутаційного S-алеля не асоціюється з розвитком гострого панкреатиту, тобто не є безпосереднім ініціюючим чинником його виникнення.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним є проведення подальшого вивчення генетичних трансверсій у хворих на гострий панкреатит та дослідження їх впливу на характер перебігу захворювання, що дозволить напрацювати нові підходи до оптимізації лікувальної тактики у таких осіб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The prevalence of cationic trypsinogen (PRSS1) and serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene mutations in Polish patients with alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis / A. Gasiorowska, R. Talar-Wojnarowska, L. Czupryniak [et al.] // Dig. Dis. Sci. – 2011. – Vol. 56. – P. 894–901.
2. Liu J. A Comprehensive study indicates PRSS1 gene is significantly associated with pancreatitis / J. Liu, H. Zhang // Int. J. Med. Sci. – 2013. – Vol. 10, N 8. – P. 981–987.
3. Frequency of SPINK1 N34S mutation in acute and recurrent acute pancreatitis / P. Rai, A. Sharma, A. Gupta, R. Aggarwal // Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. – 2014. – Vol. 21, No. 9. – P. 663–668.
4. Pedigree of a Kindred With Transheterozygous PRSS1 R122C and SPINK1 N34S Mutations / S. Amitasha, C. Deanna, A. Venkata [et al.] // Pancreas. – 2014. – Vol. 43, Iss. 6. – P. 974–976.
5. Screening of R122H and N29I Mutations in the PRSS1 Gene and N34S Mutation in the SPINK1 Gene in Mexican Pediatric Patients With Acute and Recurrent Pancreatitis / C. A. Sanchez-Ramirez, S. E. Flores-Martinez, A. G. Garcia-Zapian [et al.] // Pancreas. – 2012. – Vol. 41. – P. 707–711.
6. Brand new SPINK1 and CFTR mutations in a child with acute recurrent pancreatitis: a case report / V. Terlizzi, F. De Gregorio, A. Sepe [et al.] // Minerva Pediatr. – 2013. – Vol. 65, No.6. – P. 669–672.
7. Presence of SPINK-1 variant alters the course of chronic pancreatitis / B. Sandhu, P. Vitazka, A. Ferreira-Gonzalez [et al.] // J. of Gastroenterology and Hepatology. – 2011. – Vol. 26. – No. 6. – P. 965–969.
8. Bishop M. Association between this SPINK1 variant and clinically detectable pancreatitis / M. Bishop, P. Xenoulis, J. Steiner // J. Vet. Intern. Med. – 2013. – Vol. 27, No. 3. – P. 427–428.
9. Childhood-onset hereditary pancreatitis with mutations in the CT gene and SPINK1 gene / H. Awano, T. Lee, M. Yagi [et al.] // Pediatr. Int. – 2013. – Vol. 55, No. 5. – P. 646–649.
10. Pedigree of a kindred with Transheterozygous PRSS1 R122C and SPINK1 N34S mutations / A. Sinha, D. Cotsalas, V. Akshintala [et al.] // Pancreas. – 2014. – Vol. 43, No. 6. – P. 974–976.

Отримано 26.01.16