

УДК 616.37-002.1-092-07-085

© І. Ю. ПОЛЯНСЬКИЙ, В. В. МАКСИМ'ЮК

Буковинський державний медичний університет

## Мутація R122H гена синтезу катіонічного трипсиногена (PRSS1) у хворих на гострий панкреатит

I. YU. POLIANSKYI, V. V. MAKSYMUK

Bukovynian State Medical University

### R122H MUTATION OF THE CATIONIC TRYPSINOGEN GENE (PRSS1) IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

Вивчено частоту мутації R122H гена PRSS1 у хворих на гострий панкреатит. Встановлено, що у хворих на гострий панкреатит частіше зустрічається носійство сприятливого R-алеля (RR- і RH-генотипи 18,9 та 73,0 % відповідно) при меншій кількості патологічних HH-гомозигот (8,1 % осіб). Частота появи біліарної та небіліарної форм гострого панкреатиту (як набрякової, так і деструктивної) асоціюються з R122H-генотипом гена PRSS1 (73,7 та 72,2 % осіб проти 26,3 і 27,8 % відповідно). Носійство несприятливого мутаційного HH-генотипу асоціюється з небіліарною природою гострого деструктивного панкреатиту та характеризується тяжким клінічним перебігом хвороби.

The rate of mutation R122H PRSS1 gene in patients with acute pancreatitis was studied. It was found out that in patients with acute pancreatitis is more common carrier favorable R-allele (RR-RH-genotypes and 18.9 % and 73.0 % respectively), with fewer pathological HH-homozygote's (8.1 %). The incidence of biliary and nonbiliary forms of acute pancreatitis (edema as well as destructive) associated with genotype-R122H gene PRSS1 (73.7 % and 72.2 % of persons against 26.3 % and 27.8 % respectively). The H122H-genotype is associated with nonbiliary form of acute destructive pancreatitis and is characterized by severe clinical course of the disease.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій.** Характер розвитку гострого панкреатиту та його перебігу залежить від цілого ряду патогенетичних чинників. Важливу роль при цьому відіграють захисні механізми, спрямовані на попередження інтрапанкреатичної активації ферментів, реалізація яких значною мірою залежить від генетичних факторів [1, 2, 5, 6, 9, 10]. Разом з тим, серед багатьох факторів, які сприяють ініціації та прогресуванню гострого панкреатиту, саме генетичні чинники захворювання вивчені найменше.

Одним із основних генетично детермінованих механізмів нейтралізації внутрішньоацинарної дії трипсину є його інактивація катіонічним трипсиногеном, синтез якого кодується геном синтезу катіонічного трипсиногена (PRSS1), який міститься на довгому плечі 7-ї хромосоми (7q35). Активний центр катіонічного трипсиногена здатний розщеплювати молекулу трипсину шляхом лізису аргініну, який міститься у 122 положенні поліпептидного ланцюга цього ферменту. Слід зазначити, що саме таким чином відбувається інактивація до 80 % інтрапанкреатичного трипсину [1, 4, 7, 8].

Окремими генетичними дослідженнями встановлено, що на довгому плечі 7-ї хромосоми може зустрічатись автосомно-домінантна мутація – R122H, внаслідок якої аргінін у положенні 122 замінюється на гістидин (Arg>122>His), тобто амінокислоту, яку не здатний розпізнавати і, відповідно, розщеплювати активний центр катіонічного трипсиногена [1, 3, 5, 9]. Наявність вказаного генетичного дефекту може призводити до надмірної неконтрольованої внутрішньоацинарної активації трипсину з агресивною реалізацією його місцевої патологічної дії на паренхіму підшлункової залози та навколишні її тканини.

Разом з тим, аналіз літературних джерел щодо особливостей дистрибуції генотипічних варіантів R122H поліморфізму гена PRSS1 у хворих на гострий панкреатит різних популяційних груп засвідчив суперечливі результати [3, 5, 6, 9, 10]. Виявлені факти можна пояснити етнічними особливостями розподілу генотипів та фрагментарністю отриманих даних, які потребують подальшого вивчення та систематизації.

Крім того, цілком ймовірно, що клінічний перебіг гострого панкреатиту в носіїв R122H-генотипу

поліморфізму гена PRSS1 може характеризуватись певними особливостями, що обґрунтовує доцільність проведення таких генетично-клінічних досліджень.

**Мета роботи:** вивчити поліморфізм R122H гена PRSS1 у хворих на гострий панкреатит та провести аналіз особливостей клінічного перебігу захворювання в осіб із різним генотипом.

**Матеріали і методи.** У дослідженні взяли участь 37 осіб із різними формами гострого панкреатиту, яким після підписання інформованої зго-

ди пацієнта проведено генетичний аналіз. Серед них: 25 (67,6 %) чоловіків та 12 (34,2 %) жінок. Середній вік пацієнтів склав (48±14,4) року.

Хворих поділили на 2 групи: перша група – 17 осіб із гострим набряковим панкреатитом, друга група – 20 осіб із деструктивними формами гострого панкреатиту. Окремо проводили розподіл пацієнтів за етіологічним чинником виникнення захворювання, виділяючи дві основні його форми: біліарний та небіліарний панкреатит (табл. 1).

Алелі поліморфних ділянок третього екзону гена PRSS1 вивчали шляхом виділення геномної ДНК із

**Таблиця 1. Фенотипічна характеристика хворих на різні форми гострого панкреатиту залежно від R122H поліморфізму гена PRSS1, n=37**

Група хворих	Генотип PRSS1 (R122H)		
	R122R, % (n)	R122H, % (n)	H122H, % (n)
Гострий панкреатит, n=37	18,9 % (7)	73,0 % (27)*	8,1 % (3)
біліарний, n=19	26,3 % (5)	73,7 % (14) *	0
небіліарний, n=18	11,1 % (2)	72,2 % (13) *	16,7 % (3)
Гострий набряковий панкреатит, n=17	23,5 % (4)	76,5 % (13) *	0
біліарний, n=10	30,0 % (3)	70,0 % (7)	0
небіліарний, n=7	14,3 % (1)	85,7 % (6)	0
Гострий деструктивний панкреатит, n=20	15,0 % (3)	70,0 % (14) *	15,0 % (3)
біліарний, n=9	22,2 % (2)	77,8 % (7)	0
небіліарний, n=11	9,1 % (1)	63,6 % (7) *	27,3 % (3)

Примітка. \* – вірогідність різниць показників відносно гомозигот,  $p < 0,05$ .

лейкоцитів периферичної крові, стабілізованої ЕДТА як антикоагулянт ("Merk®", Німеччина), із наступною ампліфікацією поліморфної ділянки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на програмованому ампліфікаторі "Amplify-4L" (Росія), з індивідуальною температурною програмою для специфічних праймерів: sense (5'-GGTCCTGGGTCTCATACCTT-3'), antisense (5'-GGGTAGGAGGCTTCACACTT-3').

Для дискримінації мутаційного H122 алеля гена PRSS1 використовували ендонуклеазу рестрикції AflIII згідно з інструкціями ("Fermentas®", Німеччина). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі в присутності трисборатного буфера, концентрованого з бромідом етидію. Фрагменти візуалізували за допомогою УФ-випромінювача в присутності маркера молекулярних мас 100-1000 bp ("СибЭнзим", Росія).

Статистична обробка результатів досліджень проводилась із використанням електронних таблиць Microsoft® Office Excel (build 11.5612.5703) та програми для статистичної обробки Statgraphics Plus 5.1 Enterprise edition (©Statistical Graphics corp. 2001). Статистичну залежність між величинами

перевіряли шляхом визначення критерію Фішера, у т. ч. відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга.

#### Результати досліджень та їх обговорення.

Електрофореграма продуктів ампліфікації наведена на рисунку 1.

Довжина ампліфікату R122H поліморфізму гена PRSS1 становила 550 пар нуклеотидів (пн). За наявності в 122 кодоні 3-го екзону нуклеотидної послідовності даного гена аденіну ампліфікат розщеплювався рестриктазою AflIII на фрагменти розмірами 440 і 365 пн. У випадку трансверсії G<sup>365</sup>A сайт для рестрикції AflIII втрачався із появою фрагмента розміром 550 пн.

Дистрибуцію генотипів R122H поліморфізму гена PRSS1 у хворих на різні форми гострого панкреатиту наведено у таблиці 1. У результаті досліджень встановили, що у хворих на гострий панкреатит частіше зустрічається носійство сприятливого R-алеля (RR- і RH-генотипи 18,9 та 73,0 % відповідно) при меншій кількості патологічних HH-гомозигот (8,1% осіб). При цьому кількість гетерози-

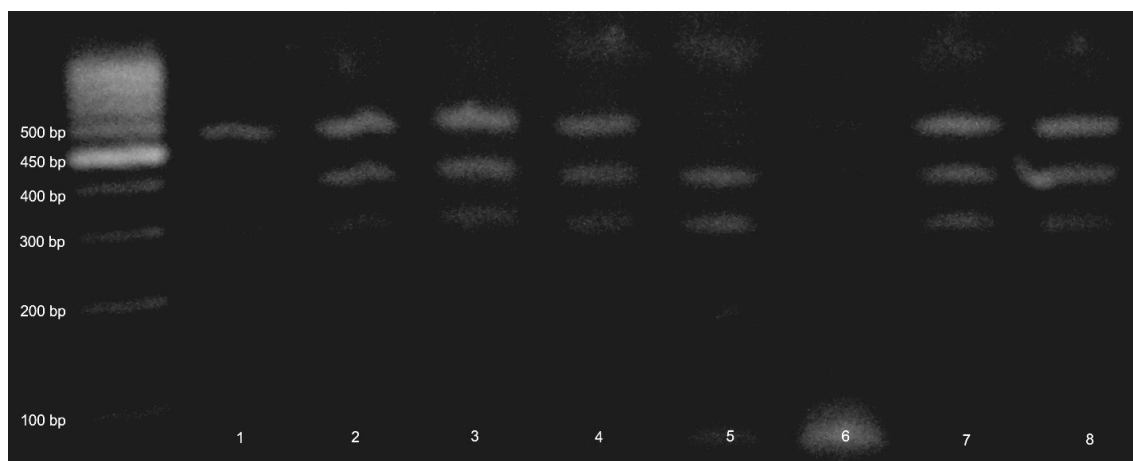


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації R122H поліморфізму гена PRSS1: 1 – гомозигота за сприятливим “диким” алелем (R122R-генотип); 2–4, 7, 8 – гетерозигота (R122H-генотип); 5 – гомозигота за мутаційним типом (H122H-генотип); 6 – негативний контроль.

готних носіїв мутаційного RH-генотипу – 73,9 % (27) осіб вірогідно переважала кількість RR- та HH-гомозигот – 18,9 % (7) та 8,1 % (3) відповідно ( $p < 0,05$ ).

Розподіл генотипів за поліморфним варіантом R122H гена PRSS1 серед обстежених відповідав очікуваній рівновазі Харді-Вайнберга.

При розподілі пацієнтів за етіологічним чинником виявили, що при біліарному панкреатиті наявності гомозиготного мутаційного HH-генотипу не відмічено в жодному випадку, а частота виявлення мутаційного гетерозиготного RH-генотипу була більшою, ніж гомозиготного сприятливого RR-генотипу – 73,7 % (14) та 26,3 % (5) відповідно ( $p < 0,05$ ). В осіб з панкреатитом небіліарного походження RR- та HH-генотипи ідентифіковані в 11,1 % (2) та 16,7 % (3) випадків відповідно, що було вірогідно менше за частоту виявлення RH-генотипу – 72,2 % (13) осіб ( $p < 0,05$ ).

При аналізі групи осіб із гострим набряковим панкреатитом встановили, що гомозиготні носії сприятливого “дикого” R-алеля зустрічались рідше, ніж гетерозиготи – 23,5 % (4) та 76,5 % (13) випадків відповідно ( $p < 0,05$ ). При цьому у хворих на біліарний панкреатит RR- та RH-генотипи зустрічались з однаковою частотою – 30,0 % (3) та 70,0 % (7) осіб відповідно ( $p = 0,16$ ). Натомість, при набряковому панкреатиті небіліарного походження виявлено чітку тенденцію до переважання мутаційного гетерозиготного генотипу. Частота виявлення RR- та RH-генотипів у цих осіб склала 14,3 % (1) та 85,7 % (6) випадків відповідно ( $p = 0,08$ ). Гомозиготних носіїв мутантного H-алеля у пацієнтів із гострим набряковим панкреатитом не виявили.

У хворих на гострий деструктивний панкреатит біліарного та небіларного генезу частота виявлення RH-генотипу була вірогідно вищою, ніж RR-

та HH-генотипів: 70,0 % (14) проти 15,0 % (3) та 15,0 % (3) відповідно ( $p < 0,05$ ). При цьому в осіб із деструктивним біліарним панкреатитом частота зустрічальності сприятливого гомозиготного та мутаційного гетерозиготного генотипів вірогідно не відрізнялась: 22,2 % (2) та 77,8 % (7) випадків відповідно ( $p = 0,099$ ). Гомозиготних носіїв несприятливого H-алеля у цій групі пацієнтів не спостерігали. Серед хворих на деструктивний панкреатит небіліарного генезу вірогідно переважали носії мутаційного H-алеля – 54,5 % (6) осіб. За частотою зустрічальності пацієнтів із RH-генотипом було достовірно більше, ніж носіїв RR- та HH-генотипів: 63,6 % (7) осіб проти 9,1 % (1) та 27,3 % (3) відповідно ( $p < 0,05$ ).

При аналізі клінічних даних та результатів лікування виявили, що у пацієнтів із мутаційним гомозиготним H122H-генотипом перебіг гострого панкреатиту характеризувався особливою тяжкістю зі швидким розвитком “агресивного” автокаталітичного процесу, поширеним некротичним ураженням підшлункової залози і навколишніх тканин та раннім формуванням гнійно-деструктивних ускладнень. У всіх трьох випадках констатовано розвиток поширеного інфікованого панкреонекрозу, перебіг якого у двох хворих ускладнився розвитком нагноєних псевдокіст із подальшим формуванням панкреатичних норичь, а в одного пацієнта – формуванням абсцесу підшлункової залози та розвитком розповсюдженого панкреатогенного перитоніту. Це регламентувало необхідність застосування в осіб із мутаційним гомозиготним H122H-генотипом особливої (більш активної) хірургічної тактики з використанням ранньої первинної хірургічної інвазії та подальшого проведення пролонгованої санації ураженої паренхіми підшлункової залози та парапанкреатичних тканин. Кількість проведених етап-

них оперативних втручань у вказаних пацієнтів коливалась в межах від 5 до 9, а середня тривалість лікування склала (91,3±11,2) ліжко-днів.

Враховуючи наведений аналіз історій хвороб пацієнтів із R122H-генотипом, а також небіліарну етіологію захворювання, на нашу думку, правомірно вважати, що у цих випадках однією з основних причин такого важкого клінічного перебігу гострого панкреатиту був його спадковий характер.

Таким чином, узагальнюючи результати досліджень, можна зробити висновки, що частота виявлення генотипів R122H поліморфізму гена PRSS1 у хворих на різні форми гострого панкреатиту вірогідно не відрізнялась. HH-генотип визначався тільки при гострому деструктивному панкреатиті небіліарної етіології. Носійство гетерозиготного RH-генотипу у наших дослідженнях асоціюється з більш частотою ініціацією гострого панкреатиту. Наявність мутаційного гомозиготного генотипу сприяє прогресуванню запального процесу в тканинах підшлункової залози з розвитком її швидкого поширеного некротичного ураження, що дозволяє розглядати носійство HH-генотипу як прогностичного маркера важкого клінічного перебігу гострого панкреатиту.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Христич Т. Н. “Панкреатический омнибус” (наследственный панкреатит) / Т. Н. Христич, Т. Б. Кендзерская, В. П. Пишак [и др.] // Мистецтво лікування. – 2006. – № 4. – С. 17–22.
2. Keim V. Genetics of pancreatitis / V. Keim // *Scand. J. Surg.* – 2005. – Vol. 94. – P. 103–107.
3. Khalid A. A 93 year old man with the PRSS1 R122H mutation, low SPINK1 expression, and no pancreatitis: insights into phenotypic non-penetrance / A. Khalid, S. Finkelstein. – *Gut.* – 2006. – Vol. 55. – P. 728–731.
4. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus // C. Le Marechal, E. Masson, J. Chen [et al.]. – *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1372–1374.
5. Liu Q. A novel mutation of PRSS1 gene in a Chinese hereditary pancreatitis family / Q. Liu, Z. Cheng, Y. Yang, Q. Ou // *Hereditas (Chin).* – 2007. – Vol. 29. – P. 1067–1070.
6. Thai family with hereditary pancreatitis and increased cancer risk due to a mutation in PRSS1 gene / T. Pho-lam, W. Thongnoppakhun, P. Yenchitsomanus, C. Limwongse // *A. World*

**Висновки.** 1. У хворих на гострий панкреатит частіше зустрічається носійство сприятливого R-алеля (RR- і RH-генотипи 18,9 та 73,0 % відповідно) при меншій кількості патологічних HH-гомозигот (8,1 % осіб).

2. Частота появи біліарної та небіліарної форм гострого панкреатиту (як набрякової, так і деструктивної) асоціюються з R122H-генотипом гена PRSS1 (73,7 та 72,2 % осіб проти 26,3 і 27,8 % відповідно).

3. Носійство несприятливого мутаційного HH-генотипу асоціюється з небіліарною природою гострого деструктивного панкреатиту, характеризується високою “агресивністю” запального процесу в тканинах підшлункової залози, розвитком її швидкого поширеного некротичного ураження, раннім формуванням гнійно-некротичних ускладнень та важким клінічним перебігом хвороби.

**Перспективи подальших досліджень.** Актуальним є проведення подальшого вивчення генетичних відхилень 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.

*J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1634–1638.

7. Raly Screening for human cationic trypsinogen (PRSS1) and trypsinogen inhibitor gene (SPINK1) mutations in a Finnish family with hereditary pancreatitis / Sari, Piironen, Anneli [et al.] // *Scandinavian J. of Gastroenterology.* – 2007. – Vol. 42, № 8. – P. 1000–1005.

8. Szmola R. Uncertainties in the classification of human cationic trypsinogen (PRSS1) variants as hereditary pancreatitis-associated mutations / R. Szmola, M. Sahin-Toth // *J. Med. Genet.* – 2010. – Vol. 47. – P. 348–350.

9. Local clustering of PRSS1 R122H mutations in hereditary pancreatitis patients from Northern Germany / F. Weiss, M. Zenker, A. Ekici [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 103, № 10. – P. 2585–2588.

10. Haplotype Analysis of Frequent Prss1 R122h Mutations in Westphalia (Germany): No Indication of A Founder Effect / F. Weiss, U. Zenker, M. Simon, P. Lerch // *Pancreas.* – 2006. – Vol. 33, № 4. – P. 507–510.

Отримано 06.10.11