

and isopropanolic phases, superoxidismutase, catalase, glutathionreductase).

Keywords: chronic pancreatitis, PRSS1, SPINK1, CFTR, oxidative stress

Резюме

Значимость генетических факторов риска и оксидативного стресса у больных латентным хроническим панкреатитом в Республике Молдова

Целью исследования было оценить значимость оксидативного стресса и некоторых генетических факторов у пациентов с латентным хроническим панкреатитом (ЛХП). Исследование включило 38 пациентов с ЛХП, мужчины/женщины – 20/18, средний возраст 49,17 ± 1,21 лет; контрольная группа (КГ) – 100 практически здоровых людей. Было подтверждено, что ЛХП в РМ является патологией с очевидной генетической основой, подтвержденной присутствием мутированных генов у 97,37% пациентов. Были подтверждены мутации следующих генов: PRSS1 (R112C) – у 25 пациентов (65,79%), SPINK1 (N34S) – у 28 (73,68%), CTFR (R117H) – у 31 (81,57%), противоположно КГ: PRSS1 (R112C) – у 63 (63%), SPINK1 (N34S) – у 74 (74%), CTFR (R117H) – у 53 (53%) пациентов, статистические отличия были существенными, $p < 0.001$. Было доказано, что оксидативный стресс имеет важную роль в механизме и эволюции ЛХП, посредством увеличения активности перикисного окисления липидов (сопряженных диен и триен, баз Shiffa в гексановой и изопропаноловой фазах, малонового диальдегида) и уменьшения активности антиоксидантной системы (общей антиоксидантной активности в гексановой и изопропаноловой фазах, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы).

Ключевые слова: хронический панкреатит, PRSS1, SPINK1, CFTR, оксидативный стресс

Introducere

În virtutea progreselor științifice din ultimii ani, există tot mai multe dovezi certe că mutațiile genice cresc susceptibilitatea pentru dezvoltarea și evoluția pancreatitei cronice (PC). Gena ce codifică tripsinogenul cationic (PRSS₁) menține enzimele pancreatice inactive; gena inhibitorului pancreatic de secreție a tripsinei (SPINK1) menține integritatea inhibitorilor, iar reglatorul de conducere transmembranar al fibrozei chistice (CFTR) reglează secreția de bicarbonați, asigurând fluiditatea sucului pancreatic. Mutațiile în genele sus-numite conduc în final la dezechilibrarea balanței intrapancreatice de proteaze și inhibitori ai acestora și autoliza țesutului pancreatic.

Pancreatita ereditară este, de regulă, cauzată de mutațiile R122H și N29I ale genei PRSS1, care sunt autosomal-dominante, cu o penetranță fenotipică de 80%, iar mutația R122C, descoperită mai recent, are capacitatea de a elimina site-ul de autoliză a

RELEVANȚA UNOR FACTORI DE RISC GENETICI ȘI A STRESULUI OXIDATIV LA PACIENȚII CU PANCREATITĂ CRONICĂ LATENTĂ DIN REPUBLICA MOLDOVA

Rodica BUGAI¹, Ion ȚÎBÎRNĂ¹, Nicolae BARBACAR²,

¹Departamentul Medicină Internă, Disciplina Medicină Internă, USMF Nicolae Testemițanu,

²Laboratorul Genetică Moleculară al Institutului de Genetică al AȘM

Summary

Relevance of genetic risk factors and oxidative stress in patients with chronic latent pancreatitis from Republic of Moldova

The purpose of the study was to evaluate the relevance of oxidative stress (OS) and some genetic factors in patients with latent chronic pancreatitis (LCP). The study included 38 patients with LCP, male/female – 20/18, median age 49,17 ± 1,21 years and the control group (CG) included 100 practically healthy persons. It has been proven that LCP in RM is a pathology with a clear genetic background through the presence of mutated genes included in the study in 97,37% of patients; mutations of the following genes have been confirmed: PRSS1 (R112C) – in 25 pts. (65,79%), SPINK1 (N34S) – in 28 pts. (73,68%), CTFR (R117H) – in 31 pts. (81,57%), vs CG: PRSS1 (R112C) – in 63 pts. (63%); SPINK1 (N34S) – in 74 pts. (74%); CFTR (R117H) – in 53 pts. (53%), the differences being statistically significant, $p < 0,001$. It has been proven that OS has an important role in the mechanism and evolution of LCP through the growth of lipid peroxidation activity (conjugated dienes and trienes, Shiff bases in the hexanic and isopropanolic phases, malonic dialdehyde) and the reduction of antioxidant system activity (total antioxidant activity in the hexanic

argininei, la fel ca și mutația R122H, fiind autosomal-dominantă [4]. Incidența celei mai frecvente mutații ale genei SPINK1 – N34S este de aproximativ 1-2,5% în populația generală [3], iar rata asociației pancreatitei este mai mare în tipul homozigot al mutației N34S [1]. Din momentul identificării genei CFTR au fost depistate peste 1900 mutații. Mutația R117H a genei CFTR se referă la clasa IV, prin defect de conducere a bicarbonaților, și se întâlnește la 0,3% din populația caucaziană; poate rezulta într-o mare varietate de semne clinice, în funcție de variația genetică prezentă [2].

Stresul oxidativ, exprimat prin dezechilibrul proceselor de lipoperoxidare și de protecție antioxidantă, reprezintă o verigă importantă în patogenезa și evoluția PC [6]. Dezechilibrul proceselor de peroxidare lipidică și de protecție antioxidantă are un rol important în agresiunea și lezarea membranelor celulare, inițiind cascada inflamatorie în cadrul diverselor afecțiuni, inclusiv al pancreatitei cronice. Conform ipotezei SO, în PC are loc blocarea metabolismului în celula acinară, fuzionarea granulelor zimogene și a lizosomilor și activarea intracelulară a enzimelor, se produce oxidarea lipidică a membranelor celulare, degenerarea mastocitelor, activarea trombocitelor, a celulelor proinflamatorii și a sistemului complementar, creșterea activității citocromului P450 [5]. Astfel, combinarea mutațiilor genice sus-numite, în asociere cu alți factori de risc exo- și endogeni, crește riscul de dezvoltare a PC de sute de ori.

Scopul studiului a fost evaluarea relevanței unor factori de risc genetici și a stresului oxidativ la pacienții cu pancreatită cronică forma latentă (PCL) din RM.

Material și metode

S-a efectuat un studiu prospectiv în care au fost incluși 38 de pacienți cu PCL, bărbați/femei – 20/18, tratați în ÎMSP SCM Sf. Arh. Mihail. Grupul de control (GC) a fost constituit din 100 persoane practic sănătoase.

Diagnosticul de PC a fost confirmat prin recoltarea datelor anamnestice, clinice, de laborator și instrumentale specifice PC în baza unui protocol de studiu, care a inclus hemoleucograma, urograma, proteinele totale, albuminele, bilirubina, transaminazele hepatice, α -amilza, GGTP, FA, glicemia, Ca seric, colesterolul, trigliceridele, diastaza, coprograma, markerii hepatitelor virale, elastaza-1 în materiile fecale, USG transabdominală, radiografia abdominală pe gol, radiografia abdominală cu pasaj baritat, r-scopia stomacului și duodenului, TC a abdomenului simplă și/sau spiralată, TC a abdomenului prin RMN /în regim colangiografic, FEGDS, ECG, R-grafia pulmonară, irigoscopia, FCS). Polimorfismul genelor

candidate pentru dezvoltarea pancreatitei – PRSS1, SPINK1, CFTR – s-a determinat în laboratorul Institutului de Genetică al AȘ din RM; ca specimen a fost folosit sângele venos, prin metoda de analiză a lungimii fragmentelor amplificate și a fragmentelor polimorfe de restricție (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP).

Primerii utilizați în amplificarea probelor de ADN uman pentru determinarea polimorfismului genei SPINK1, mutația N34S: forward 5' – AACCAGG-GAGATCTGTGATA-3, revers 5' – GTCAGCCACATCAATAGAGG-3'; pentru determinarea polimorfismului genei PRSS1, mutația R122C: S5-GGTCCTGGTCT-CATCCTT-3, AS5-GGGTAGGCTTCACACACACTT-3; pentru determinarea polimorfismului genei CFTR, mutația R117H: D5'-ACCCGGATAACAAGGAGGAGG-3'R117H, R 5'-GGCCTGTGCAAGGAAGTATT-3'. Activitatea sistemelor de peroxidare lipidică și antioxidant a fost apreciată prin determinarea nivelului dienei conjugate, trienei conjugate, bazelor Shiff în fazele hexanică și izopropanolică, dialdehida malonică (DAM) și, respectiv, a activității antioxidante totale (AAT) în fazele hexanică și izopropanolică, superoxid-dismutazei (SOD), catalazei, glutationreductazei (GR) în Laboratorul de biochimie al USMF N. Testemițanu, ca specimen fiind folosit sângele venos. Metode statistice: tabele de contingență 2x2, criteriul t-Student, χ^2 , Fisher, coeficientul corelației Pearson, analiza variațională (procedura ANOVA).

Rezultate și discuții

Vârsta medie a pacienților cu PCL a fost de $49,71 \pm 1,21$ ani (29-59 ani) vs GC – $23,23 \pm 0,49$ ani (19-39 ani). În funcție de vârsta la momentul cercetării, pacienții au fost repartizați în subgrupe, conform recomandărilor OMS [7].

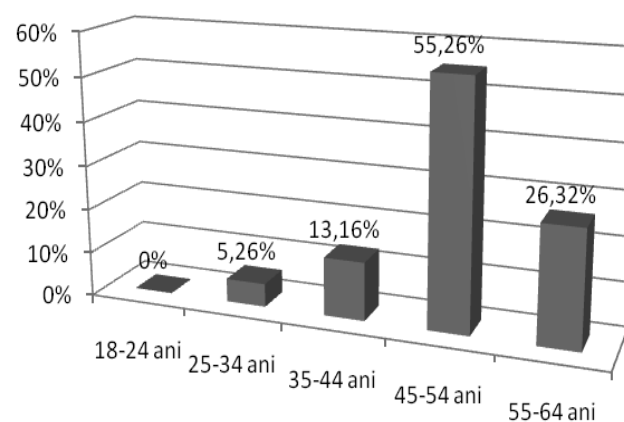


Figura 1. Repartizarea pacienților cu PC după grupa de vârstă

Datele din figura 1 relevă o frecvență mai înaltă a PC forma latentă în grupa de vârstă 45-54 ani – 21 pacienți (55,26%), urmată de cei cu vârsta 55-64 ani – 10 (26,32%), 35-44 ani – 5 (13,16%), 25-34 ani – 2 (5,26%).

Vârsta medie de debut al bolii a fost de $33,71 \pm 1,44$ ani. Evaluarea pacienților după vârsta de debut al bolii (figura 2) a demonstrat o prevalență mai înaltă la vârsta 35-44 ani – la 17 (44,74%) pacienți, urmată de cei de 45-54 ani – la 4 (10,53%), 18-24 ani – la 3 (7,89%) și până la 18 ani – la 2 (5,26%) pacienți, care ar putea fi explicată printr-un debut insidios la 29 (76,32%) și acut la 9 (23,68%) pacienți.

Numărul de pusee de pancreatită acută, care au precedat diagnosticul de PC în rândul celor cu debut acut, a fost de $0,29 \pm 0,09$, iar numărul de pusee de pancreatită acută după stabilirea PC a fost de $0,40 \pm 0,23$.

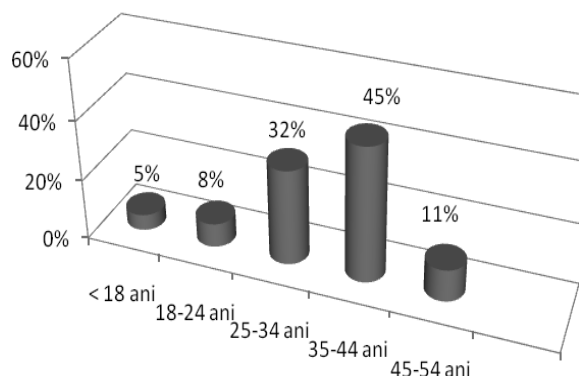


Figura 2. Repartizarea pacienților după vârsta de debut al bolii

Vârsta medie de diagnosticare a bolii a fost de $35,05 \pm 1,25$ ani. Diagnosticul de pancreatită (figura 3) a fost stabilit cu preponderență la vârsta de 35-44 ani – 18 (47,37%) pacienți, urmat de vârsta 45-54 ani – 12 (31,58%), 25-34 ani – 2 (5,26%).

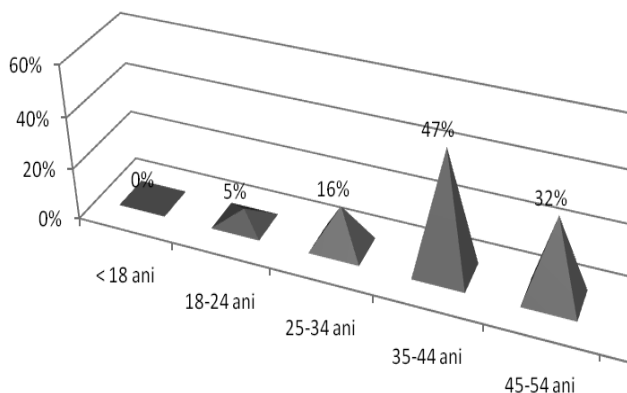


Figura 3. Repartizarea pacienților după vârsta de diagnosticare a bolii

Durata patologiei pancreatice a fost în medie de $16,0 \pm 1,37$ ani, inclusiv până la 5 ani – la 4 (10,53%), de la 5 la 10 ani – la 7 (18,42%), >10 ani – la 27 (71,05%) pacienți. Perioada de timp de la apariția semnelor clinice până la diagnosticarea PC a fost în medie de $16,00 \pm 1,37$ ani.

Dereglarea funcției endocrine a fost constatată la 25 (65,79%) pacienți, dintre care 1 (2,63%) cu de-

reglarea toleranței la glucoză, 4 (10,53%) cu DZ tip II, ID, 17 (44,76%) cu DZ tip II, IND cu ADO, 3 (7,86%) cu DZ tip II fără ADO.

Prezența mutațiilor genice incluse în studiu s-a decelat la 37 (97,37%) din pacienți și la 94 (94%) din GC, fapt ce demonstrează o frecvență net superioară altor studii internaționale. La pacienții cu PC latentă (figura 4) s-au confirmat mutații ale genelor: PRSS1 (R112C) – la 25 (65,79%), 14 (36,84%) heterozigoți, 11 (28,95%) homozigoți; SPINK1 (N34S) – la 28 (73,68%), 13 (34,21%) heterozigoți, 15 (39,47%) homozigoți; CFTR (R117H) – la 31 (81,57%), 19 (50%) heterozigoți, 12 (31,57%) homozigoți vs GC (figura 5): PRSS1 (R112C) – la 63 (63%), 61 (61%) heterozigoți, 2 (2%) homozigoți; SPINK1 (N34S) – la 74 (74%), 66 (66%) heterozigoți, 8 (8%) homozigoți; CFTR (R117H) – la 53 (53%), 42 (42%) heterozigoți, 11 (11%) homozigoți, diferențele fiind statistic semnificative, $p < 0,001$. La 6 (15,79%) pacienți s-au determinat mutații la nivelul unei singure gene, la 15 (39,47%) – în 2 gene și la 16 (42,11%) – în 3 gene.

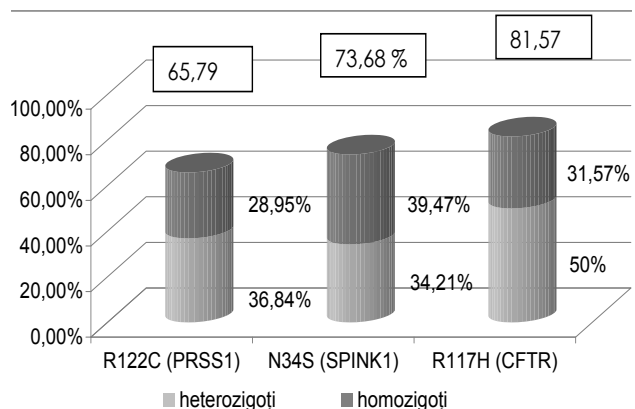


Figura 4. Prezența mutațiilor genice R122C (PRSS1), N34S (SPINK1), R117H (CFTR) la pacienții homozigoți și heterozigoți cu pancreatită cronică latentă

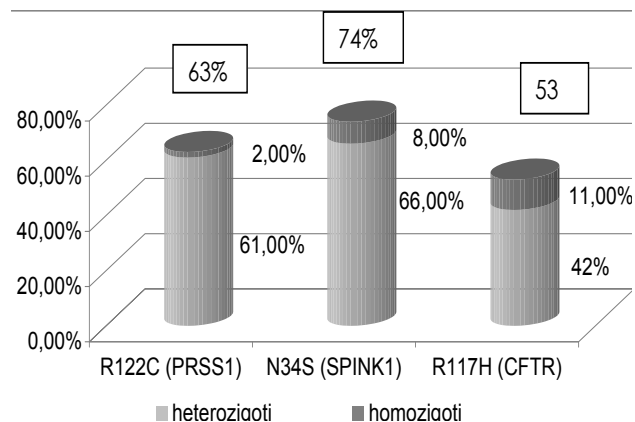


Figura 5. Prezența mutațiilor genice R122C (PRSS1), N34S (SPINK1), R117H (CFTR) la homozigoți și heterozigoți din grupul de control

Indicii POL și SAO la pacienții cu pancreatită cronică latentă versus grupul de control

Indicele evaluat	GC, n=100		Pacienți cu PCL, n=38		p
	M	m	M	m	
HPL-timp. hexan (diene conjugate), uc/ml	11,44	0,09	14,34	0,49	<0,001
HPL-inter. hexan (triene conjugate), uc/ml	3,63	0,08	4,89	0,21	<0,001
HPL-tardivi hexan. (baze Shiff), uc/ml	1,26	0,05	2,49	0,25	<0,001
HPL-timp. izopr. (diene conjugate), uc/ml	11,29	0,08	13,36	0,24	<0,001
HPL-inter. izopr. (triene conjugate), uc/ml	5,84	0,05	6,80	0,18	<0,001
HPL-tardivi izopr. (baze Shiff), uc/ml	1,10	0,03	1,62	0,06	<0,001
DAM, μM/s.l	16,75	0,24	20,72	0,59	<0,001
AAT-hexan, mMDPPH/s.l	10,81	0,19	7,17	0,34	<0,001
AAT-izopr. mMDPPH/s.l	11,17	0,23	7,09	0,46	<0,001
SOD, u/c	1474,35	18,67	1302,73	25,92	<0,001
Catalaza, μM/s.l	13,73	0,38	9,82	0,62	<0,001
GR, μM/s.l	6,52	0,10	4,37	0,09	<0,001

Evaluarea indicilor POL și a SAO (vezi tabelul) a relevat modificări statistic semnificative ($p < 0,001$) la pacienții cu PCL, comparativ cu GC, la toți parametrii. Indicii POL crescuți la pacienții cu PC vs GC: dienele conjugate faza hexanică – de 1,25 ori ($14,34 \pm 0,49$ vs $11,44 \pm 0,09$ uc/ml), trienele conjugate faza hexanică – de 1,35 ori ($4,89 \pm 0,21$ vs $3,63 \pm 0,24$ uc/ml), bazele Shiff faza hexanică – de 1,98 ori ($2,49 \pm 0,25$ vs $1,26 \pm 0,05$ uc/ml), dienele conjugate faza izopropanolică – de 1,21 ori ($13,66 \pm 0,24$ vs $11,29 \pm 0,08$ uc/ml), trienele conjugate faza izopropanolică – de 1,16 ori ($6,80 \pm 0,18$ vs $5,84 \pm 0,05$ uc/ml), bazele Shiff faza izopropanolică – de 1,47 ori ($1,62 \pm 0,06$ vs $1,10 \pm 0,03$ uc/ml), DAM – de 1,24 ori ($20,72 \pm 0,59$ vs $16,75 \pm 0,24$ uc/ml). Se observă o creștere preponderentă a dienelelor, trienelelor conjugate, bazelor Shiff în faza hexanică. SAO a demonstrat parametri scăzuți la pacienții cu PCL vs GC: AAT faza hexanică – de 1,51 ori ($7,17 \pm 0,34$ vs $10,81 \pm 0,19$ mMDPPH/s.l), AAT faza izopropanolică – de 1,58 ori ($7,09 \pm 0,46$ vs $11,17 \pm 0,23$ mMDPPH/s.l), SOD – de 1,17 ori ($1302,73 \pm 25,92$ vs $1474,35 \pm 18,67$ u/c), catalaza – de 1,40 ori ($9,82 \pm 0,62$ vs $13,73 \pm 0,38$ μM/s.l), GR – de 1,49 ori ($4,37 \pm 0,09$ vs $6,52 \pm 0,10$ μM/s.l).

Evaluarea interdependențelor corelaționale dintre valorile POL/SAO și unii parametri clinici au demonstrat corelații veridice. Există o corelație indirectă între vârstă și indicii POL/SAO: cu cât e mai mare vârsta, cu atât sunt mai scăzute valorile SAO: AAT fază hexanică ($r = -0,63$, $p < 0,001$), AAT fază izopropanolică ($r = -0,62$, $p < 0,001$), SOD ($r = -0,49$, $p < 0,001$), catalaza ($r = -0,45$, $p < 0,001$), GR ($r = -0,49$, $p < 0,001$) și cu atât sunt mai crescute valorile POL: diene conjugate faza

hexanică ($r = 0,65$, $p < 0,001$), triene conjugate faza hexanică ($r = 0,40$, $p < 0,001$), baze Shiff faza hexanică ($r = 0,36$, $p < 0,001$), diene conjugate izopropanolică ($r = 0,52$, $p < 0,001$), triene conjugate izopropanolică ($r = 0,42$, $p < 0,001$), baze Shiff fază izopropanolică ($r = 0,29$, $p < 0,001$), DAM ($r = 0,38$, $p < 0,001$).

Valoarea indicelui fumătorului este în corelație indirectă cu SAO: AAT faza hexanică ($r = -0,41$, $p < 0,01$), AAT fază izopropanolică ($r = -0,40$, $p < 0,01$), SOD ($r = -0,47$, $p < 0,001$), catalaza ($r = -0,40$, $p < 0,01$), GR ($r = -0,48$, $p < 0,001$) și în corelație directă cu creșterea valorile POL: diene conjugate faza hexanică ($r = 0,51$, $p < 0,001$), triene conjugate faza hexanică ($r = 0,36$, $p < 0,01$), baze Shiff faza hexanică ($r = 0,19$, $p > 0,05$), diene conjugate ($r = 0,41$, $p < 0,001$), triene conjugate fază izopropanolică ($r = 0,21$, $p > 0,05$), baze Shiff fază izopropanolică ($r = 0,26$, $p > 0,05$), DAM ($r = 0,24$, $p > 0,05$). Odată cu creșterea IMC descrește activitatea SAO: AAT – fază hexanică ($r = -0,21$, $p < 0,02$), AAT – fază izopropanolică ($r = -0,15$, $p < 0,05$), GR ($r = -0,17$, $p < 0,05$). Vârsta de debut al bolii este în corelație directă cu valorile SAO – catalaza ($r = 0,27$, $p < 0,01$) și invers proporțională cu indicele POL – baze Shiff fază hexanică ($r = -0,25$, $p < 0,05$). Analiza valorilor medii, erorii-standard și a testului Fisher a dovedit că prezența alcoolului și a fumăturii la persoanele incluse în studiu modifică statistic semnificativ ($p < 0,001$) toți indicii SO prin activarea POL și diminuarea SAO.

Prin utilizarea analizei variaționale (programul ANOVA) s-a încercat de a determina relațiile dintre mutațiile genice și valorile POL/SAO la pacienții cu PCL, care a relevat modificări statistic semnificative numai la nivelul POL prin creșterea nivelului de diene conjugate fază izopropanolică (uc/ml) la homozigoți comparativ cu heterozigoții și cei fără modificări genice în dependență de prezența alelelor mutante: R122C (PRSS1) – $14,22 \pm 0,31$ vs $13,89 \pm 0,31$, vs $13,06 \pm 0,29$, $F = 3,97$, $p < 0,05$ și N34S (SPINK1) – $14,40 \pm 0,34$ vs $13,31 \pm 0,23$, vs $13,54 \pm 0,37$, $F = 3,93$, $p < 0,05$.

Modificările POL/SAO remarcate la pacienții studiați ar putea fi explicate prin diferite mecanisme, ca urmare a consumului cronic de alcool, tabagismului, subnutriției, maldigestiei, malabsorbției de vit. E, C, deficit de seleniu prin necesități crescute (Van Gossum s.c. 1996) și a altor factori exo- și endogeni.

Concluzii

1. Pancreatita cronică formă latentă la pacienții din Republica Moldova este o patologie cu un evident substrat genetic prin prezența mutațiilor R122C (PRSS1), N34S (SPINK1), R117H (CFTR).

2. Stresul oxidativ deține un rol important în mecanismul și evoluția pancreatitei cronice latente.

3. A fost demonstrată absența unei relații între modificările genelor studiate PRSS1 (R122C), SPINK1 (N34S), CFTR (R117H) și indicii POL/SAO, cu excepția creșterii nivelului dieneilor conjugate, fază izopropionică.

4. Modificările semnificative ale indicilor POL și ale activității SAO la pacienții cu pancreatită cronică latentă pot fi explicate prin acțiunea factorilor de risc exo- și endogeni.

Bibliografie

1. Hirota M., Ohmuraya M., Baba H. *Genetic background of pancreatitis*. In: Postgrad. Med. 2 J., 2006; nr. 82, p. 775-778.
2. Jung J. General et al. *Mechanisms of CFTR Functional Variants That Impair Regulated Bicarbonate Permeation and Increase Risk for Pancreatitis but Not for Cystic Fibrosis*. In: PLoS Genet., Jul. 2014; nr. 10(7), p. e1004376.
3. Ohmuraia M., Yamamura K. *The role of Serine Protease Inhibitor Katal Type 1 (SPINK1) in pancreatic disease*. In: Exp. Anim., 2011, nr. 60(5); p. 433-4443.
4. Pfützer R., Myers E., Applebaum-Shapiro S. et al. *Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis*. In: Gut., 2002, Feb.; nr. 50(2), p. 271-272.
5. Monfared S.S.M.S., Vahidi H., Abdolghaffari A. et al. *Antioxidant therapy in the management of acute, chronic and post-ERSP pancreatitis: A systemic review*. In: World J. Gastroenterol., 2009, sept. 28, nr. 15 (36), p. 4481-4490.
6. Shoenberg M.H., Birk D., Beger H.G. *Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis*. In: Am. J. Clin. Nutr., 1995; nr. 62, p. 1306S-1314S.
7. *ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision*. 2nd ed. 3 v, p. 94.

Rodica Bugai, asist. univ.,
 Departamentul Medicină Internă,
 Disciplina Medicină Internă,
 USMF Nicolae Testemițanu
 Tel.: 022 29 26 74; mob. 069762166
 E-mail: rodica_b2004@yahoo.com