

IMPACTUL UNOR FACTORI DE RISC GENETICI ÎN PANCREATITA CRONICĂ

Rodica BUGAI,

Catedra Medicină Internă nr. 3, USMF „N. Testemițanu”

Summary

The impact of genetic risk factors in chronic pancreatitis

Recent breakthroughs in understanding the etiology and pathways toward pancreatic diseases, and especially acute and chronic pancreatitis (CP), reveal that specific variation in the genomic DNA sequence of individuals strongly influence their susceptibility to pancreatitis, the severity and nature of the inflammatory process, and the likelihood of various complications. The purpose of the study was to assess the impact of genetic risk factors in the development of CP in the Moldovan population and included 25 patients with relapsed and pseudotumoral CP and 30 healthy people with PRSS1 and SPINK1 gene polymorphism determination. Venous blood being used as a sample, using the method of polymerase chain reaction (PCR) and corresponding primers, at the Academy of Sciences Institute of Genetics. The high frequency of mutant alleles in the gene that encodes PRSS1 cationic trypsinogen and the gene of the pancreatic PSTI/SPINK1 trypsin inhibitor detected in patients with CP with recurrent and pseudotumoral form vs. healthy individuals indicates the importance of these mutations in the development of the disease and requires prospective studies. The assessment of genetic risk factors and their interaction with other exo- and endogenous factors would enable the prevention, early diagnosis and reduction of risks in CP.

Keywords: chronic pancreatitis, PRSS1 mutations, SPINK1 mutations.

Резюме

Воздействие генетических факторов риска при хронических панкреатитах

Последние достижения в понимании этиологии и путей развития заболеваний поджелудочной железы, особенно острого и хронического панкреатита (ХП), показывают, что последовательность геномной ДНК людей сильно влияет на их восприимчивость к развитию панкреатита, на серьезность воспалительного процесса и вероятность различных осложнений. Целью исследования было оценить роль генетических факторов риска в развитии ХП у населения РМ и включило 25 пациентов с рецидивирующей и псевдотуморальной формами ХП с определением полиморфизма ген PRSS1 и SPINK1. В качестве образца была использована венозная кровь, методом полимеразной цепной реакции и соответствующих праймеров в Институте Генетики АНПМ. Высокая частота мутантных аллелей в гене PRSS1 и PSTI/SPINK1, обнаруженных у пациентов с хроническим рецидивирующим или псевдотуморальным

панкреатитом по сравнению со здоровыми лицами, указывает на важность этих мутаций в развитии заболевания и требует дополнительных исследований. Оценка генетических факторов риска и их взаимодействия с другими экзо- и эндогенных факторами позволит провести профилактику, раннюю диагностику и снизить риск ХП.

Ключевые слова: хронический панкреатит, мутации PRSS, мутации PSTI/SPINK1.

Introducere

Pancreatita cronică (PC) este o patologie progresivă, caracterizată prin fibrogeneză și dereglarea funcției pancreatice. Vasta diversitate de factori etiologici impune studierea lor mai profundă și determinarea rolului fiecăruia dintre ei, precum și a interacțiunilor lor în dezvoltarea PC. Studiile efectuate în ultimele decenii au demonstrat că factorii genetici joacă un rol important în susceptibilitatea pentru afectarea țesutului pancreatic, severitatea și evoluția bolii și au deschis noi perspective în abordarea acestei patologii.

La momentul actual, sunt cunoscuți următorii factori genetici, ce țin de PC:

- Mutații ale genei PRSS1, ce codifică tripsinogenul cationic.
- Mutații ale inhibitorului pancreatic de tripsină PSTI/SPINK1.
- Mutații ale genei proteinei reglatoare transmembranice a fibrozei chistice CFTR.
- Mutații ale genei PRSS2, ce codifică tripsinogenul anionic.
- Polimorfismul altor gene implicate în PC:
 - genele ce reglează răspunsul imun (TNF-238A, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-1);
 - genele ce participă în metabolismul alcoolului: alcool dehidrogenaza 2, aldehyd dehidrogenaza 2, P450-2E1 (CYP2E1), GSTM1, GSTT1;
 - UDP glucuronoziltransferaza (UGT1A7), gena chimotripsinogenului C, deficitul de α 1-antitripsină.

Comfort V. și Steinberg A., în anul 1952, au fost primii care au menționat că PC se poate acumula în familiile selectate, sugerând un fundal genetic [4]. În 1996, mai multe grupuri de savanți au depistat simultan o genă pentru pancreatita cronică ereditară în brațul lung al cromozomului 7 (7q35). Whitcomb D.C. și coaut., în 1996, primii au indentificat mutația R117H în exonul 3 al tripsinogenului cationic (PRSS₁) [18], care a fost independent confirmată de Férec C. și coaut. [5], iar a doua mutație a genei PRSS1-N211 a fost localizată în exonul 2, în anul 1997 [7]. În 1998 a fost propusă o nouă clasificare a mutațiilor genetice umane, conform căreia mutațiile R117H și N211 au

fost denumite, respectiv, R122H și N29I [2]. În perioada ce a urmat au fost raportate peste 24 de mutații în gena tripsinogenului cationic, dar mutațiile R122 H și N29I ale genei PRSS₁ au fost apreciate ca fiind cele mai frecvente mutații asociate cu PC în Franța, Germania, Marea Britanie, Japonia, Polonia, SUA, Australia [12, 13, 16, 18] și nici un caz de PCE nu a fost raportat în Africa.

Descoperirea, în 1996, a mutațiilor tripsinogenului cationic, asociate cu pancreatita, au demonstrat că tripsinogenului îi revine rolul principal în patogeniza pancreatitei umane [19]. Mutația genei ce codifică tripsinogenul cationic (PRSS₁), localizată în brațul lung al cromozomului 7(7q35), reprezintă tranziția adeninei cu guanina (CGC → CAC); în consecință, are loc substituția argininei cu histidina în poziția 122 (R122H) în succesiunea aminoacidică a enzimei. Această mutație este cauza dezvoltării rezistenței tripsinogenului la hidroliză, a autoactivării necontrolate în cascadă a tripsinogenului, cu activarea ulterioară de către acesta a altor proenzime și autoliza țesutului pancreatic [4].

Rămâne deocamdată incert mecanismul prin intermediul căruia mutația N29I duce la dezvoltarea PE. Se presupune că această mutație contribuie la autoactivarea tripsinogenului, dereglând interrelația cu inhibitorul pancreatic de secreție a tripsinei [6], sau împiedică inactivarea tripsinei, modificând accesibilitatea sectorului inițial al hidrolizei sale [3]. Mutațiile R122 H și N29I sunt autosomal-dominante și determină dezvoltarea pancreatitei ereditare cu o penetranță fenotipică de 80%.

Efectul mutațiilor în gena inhibitorului pancreatic de secreție a tripsinei (PSTI – *Pancreatic Secretory Tripsin Inhibitor*), care este cunoscut și ca inhibitorul proteazei serinice tip 1 Kazal (SPINK1 – *Serine Proteaze Inhibitor Kazal type 1*), în instalarea PC a fost raportat în anul 2000 de către Witt H. și coaut. [17]. Inițial SPINK1 a fost izolată din pancreas, apoi identificată în celulele producătoare de mucus ale tractului gastrointestinal și într-un șir de alte țesuturi, inclusiv în plămâni, ficat, rinichi, ovare, glande mamar. PSTI/SPINK1 este sintetizat în celulele acinare ale pancreasului, ambalat cu enzimele digestive în granule secretorii și este capabil de a lega serina tripsinei cu lizina centrului său activ, pentru a forma un complex stabil [15]. Deoarece raportul SPINK1/tripsinogen este de 1/20, SPINK1 poate bloca doar 20% din activitatea tripsinului. În situația în care cantitatea sau activitatea SPINK1 este redusă, tripsinogenul se poate activa prematur în tripsină, cu activarea ulterioară a altor enzime, cu afectarea celulelor acinare și dezvoltarea pancreatitei [8, 9].

Mutațiile SPINK1 își exercită acțiunea prin diferite mecanisme: mutația M1T, care distruge codonul de start, are o rată de moștenire ereditară dominantă, iar mutația N34S SPINK1, care este întâlnită mai des în PC, este autosomal-recisivă.

Există o variantă genetică protectivă în gena PRSS2 a tripsinogenului anionic, și anume codonul G191R, care reduce susceptibilitatea pentru PC.

Astfel, prezintă interes evaluarea genelor implicate în dezvoltarea PC în populația heterogenă a RM.

Scopul lucrării: evaluarea impactului unor factori de risc genetici în evoluția pancreatitei cronice la pacienții din Republica Moldova.

Materiale și metode

Studiul a inclus 25 de pacienți cu PC, dintre care: 20 – cu PC cu recidive (12 bărbați și 8 femei), cu vârsta de 27-55 de ani (grupul A) și 5 – cu PC pseudotumorală (4 bărbați și o femeie), cu vârsta 36-54 de ani (grupul B). Grupul de control l-au constituit 30 de persoane practic sănătoase.

Diagnosticul de PC a fost stabilit în baza datelor anamnestice, clinice și paraclinice (hemoleucograma; α -amilaza urinei; analiza biochimică a sângelui: glucoza, α -amilaza, lipaza, proteina totală, albumina, bilirubina, GGTP, FA, Ca; coprograma; elastaza-1 în materiile fecale; ecografia abdominală; TC abdominală, ERCP). Ca speciment pentru determinarea polimorfismului genelor PRSS1 și SPINK1 a fost folosit sângele venos, cu utilizarea metodei de polimerizare în lanț (PCR) și a primerilor corespunzători, în laboratorul Institutului de Genetică al AȘRM.

Rezultate și discuții

Rezultatele au demonstrat prezența anamnezei familiale de PC la 12 (60%) pacienți din gr. A și la 3 (60%) din gr. B. În gr. de pacienți cu PC cu recidive s-a determinat prezența alelelor mutante ale PRSS1 la 95% – 9 homozigoți (45%) și 10 heterozigoți (50%), versus 60% – 1 homozigot (3,3%) și 17 heterozigoți (56,6%) în grupul de control. Referitor la prezența alelelor mutante ale PSTI/SPINK1 în același grup, am obținut următoarele rezultate: prezența alelelor mutante în 75% – 9 homozigoți (45%) și 6 heterozigoți (30%), vs 80% – 3 homozigoți (10%) și 21 (70%) heterozigoți în grupul de control. Evaluarea grupului de pacienți cu PC pseudotumorală a demonstrat prezența alelelor mutante ale PRSS1 în 100% cazuri – 1 pacient (20%) homozigot și 4 (80%) heterozigoți – și a alelelor mutante ale PSTI/SPINK1 la fel în 100% – 2 (40%) pacienți homozigoți și 3 heterozigoți (60%).

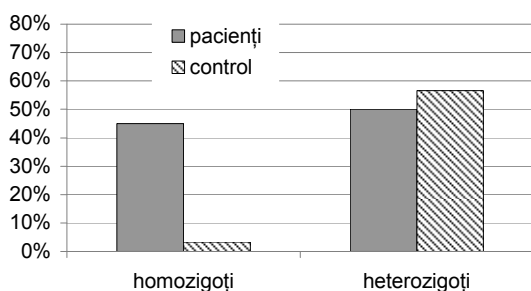


Figura 1. Prezența alelelor mutante ale PRSS1 la pacienții cu PC cu recidive

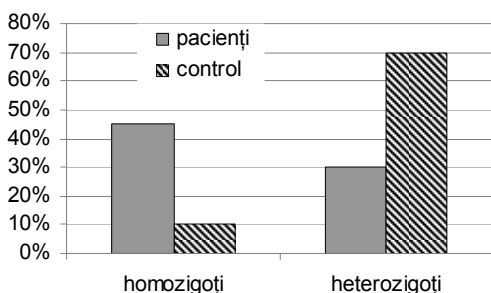


Figura 2. Prezența alelelor mutante ale SPINK1 la pacienții cu PC cu recidive

Insuficiența exocrină a fost confirmată la toți pacienții, iar insuficiența endocrină – la 6 din gr. A și la 2 din gr. B. Printre bolnavii cu diabet zaharat (DZ) 40% au necesitat insulină și 60% antidiabetice perorale.

De remarcat faptul că, conform datelor din literatură, incidența celei mai frecvent întâlnite mutații N34S a SPINK1 este de aproximativ 1-2,5% în populația generală [10], dintre care aproximativ 1% este heterozigotă pentru N34S [17] și mai puțin de 1% din purtători dezvoltă pancreatite [11, 20]. Frecvența mutației N34S este considerabil mai mare în rândurile pacienților care dezvoltă pancreatite, decât printre cei sănătoși, iar rata asociației pancreatitei este mai mare în tipul homozigot al mutației N34S [8, 9], la persoanele sănătoase fiind detectată cu o frecvență de 1/10.000.

Depistarea alelelor mutante ale genelor PRSS1 și SPINK1 la majoritatea pacienților cu PC cu recidive și pseudotumorală investigați, preponderent în rândul homozigoților, demonstrează rolul lor în susceptibilitatea pentru dezvoltarea acestei patologiei, cu precădere la persoanele cu anamneză familială de pancreatită cronică.

Concluzii

1. Frecvența înaltă a alelelor mutante în gena ce codifică tripsinogenul cationic PRSS1 și în gena inhibitorului pancreatic de tripsină PSTI/SPINK1 la pacienții cu pancreatită cronică cu recidive și forma pseudotumorală, în raport cu persoanele sănătoase, denotă importanța acestor mutații în dezvoltarea bolii și necesită studiere de perspectivă.

2. Evaluarea factorilor de risc genetici și a interacțiunii lor cu alți factori exo- și endogeni ar permite prevenirea, diagnosticarea timpurie și reducerea riscurilor în pancreatita cronică.

3. Rezultatele obținute impun atenționarea medicilor-practicieni asupra necesității depistării pacienților cu anamneză familială de pancreatită cronică, excluderea factorilor de risc și investigarea, la necesitate, a statutului lor genetic.

Bibliografie

1. Țibîrnă I., Bugai R. *Pancreatita cronică. Actualitate, etiologie și patogenie (I). Sistemul de clasificări. Diagnosticul de laborator și instrumental (II)*. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. 2008; nr. 2 (16), p. 144-158.
2. Antonarakis S.E. *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*. In: Nomenclature Working group. Hum. Mutat., 1998; nr. 11, p. 1-3.
3. Charnley R.M. *Hereditary pancreatitis*. In: Wid. J. Gastroenterol., 2003; nr. 9 (1), p. 1-4.
4. Comfort M., Steinberg A. *Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis*. In: Gastroenterol., 1952; nr. 21, p. 54-63.
5. Férec C., Ragueneas O., Salomon R. et al. *Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis*. In: J. Med. Genet., 1999; nr. 36, p. 228-233.
6. Gasiorowska A., Talar-Wojnarowska R., Czupryniak L. et al. *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*. In: Dig. Dis. Sci., 2011; March; nr. 56(3), p. 894-901.
7. Gorry M.C., Gabbazadeh D., Furey W. et al. *Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis*. In: Gastroenterol., 1997; nr. 113, p. 1063-1068.
8. Hirota M., Ohmuraya M., Baba H. *The role of trypsin, trypsin-inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis*. In: J. Gastroenterol., 2006; nr. 41, p. 832-836.
9. Hirota M., Ohmuraya M., Baba H. *Genetic background of pancreatitis*. In: Postgrad. Med. 2 J., 2006; nr. 82, p. 775-778.
10. Ohmura M., Yamamura K. *The role of Serine Protease Inhibitor Kazal Type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases*. In: Exp. Anim., 2011, nr. 60(5), p. 433-444.
11. Pfützner R.H., Barmada N.M., Brunskill A.P.J. et al. *SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis*. In: Gastroenterology, 2000; nr. 119, p. 615-623.
12. Reddy D.N., Prasad S.S. *Genetic basis of chronic pancreatitis in Asia Pacific region*. March, 2011; nr. 26(2), p. 2-5.
13. Rosendahl J, Bödeker H. et al. *Hereditary chronic pancreatitis*. In: OJRD, 04 jan., 2007; nr. 2, p. 1.
14. Teich N., Rosendahl J., Tóth M., Mössner J., Sahin-Tóth M. *Mutations of Human Cationic Trypsinogen (PRSS1) and Chronic Pancreatitis*. In: Hum. Mutat., 2006, August; nr. 27(8), p. 721-730.
15. Wang Gai-Ping, Xu Cun-Shuan. *Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor*. In: World

- J. Gastrointest. Pathophysiol., 2010, June 15; nr. 1(2), p. 85-90.
16. Weiss F.U., Martin Zenker M., Arif Bülent Ekici A.B. et al. *Local Clustering of PRSS1 R122H Mutations in Hereditary Pancreatitis Patients From Northern Germany*. In: The Am. J. of Gastroenterol., 2008; nr. 103, p. 2585-2588.
 17. Witt H., Luck W., Becker M. et al. *Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis*. In: JAMA, 2001; nr. 285, p. 2716-2717.
 18. Whitcomb D.C., Gorry M.C., Preston R.A., et al. *Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene*. In: Nat. Genet., 1996; nr. 14, p. 141-145.
 19. Whitcomb D.C., Preston R.A., Aston C.E., et al. *A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35*. In: Gastroenterology, 1996; nr. 110, p. 1975-1980.
 20. Whitcomb D.C. *How to think about SPINK and pancreatitis*. In: Am. J. Gastroenterol., 2002; nr. 97, p. 1085-1088.

Rodica Bugai, asistent universitar,
Catedra Medicină Internă nr. 3,
USMF „N. Testemițanu”,
tel. 0697-62166;
e-mail: rodica_b2004@yahoo.com

GENETIC MUTATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC PANCREATITIS IN UKRAINE

N. B. GUBERGRITS, O. A. GOLUBOVA,

Department of Internal Medicine n. a. A. Y. Gubergrits,
Donetsk National Medical University
n. a. M. Gorky, Ukraine

Summary

The authors conducted a genetic analysis of patients with chronic pancreatitis in Ukraine. It turned out that more than a quarter of patients had mutations of PRSS1, SPINK1, CFTR genes. Peculiarities of combinations of ADH, ALDH, CYP2E1 genes, encoding enzymes involved in ethanol metabolism, are revealed. Obtained data testify to the reasonability of continuing research in this field.

Keywords: chronic pancreatitis, genetic predisposition, ethanol metabolism.

Резюме

Генетические мутации у больных хроническим панкреатитом в Украине

Авторы провели генетический анализ у больных хроническим панкреатитом в Украине. Оказалось, что более чем у четверти больных имеют место мутации генов PRSS1, SPINK1, CFTR. Выявлены особенности комбинации генов ADH, ALDH, CYP2E1, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме этанола. По-

лученные данные свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований в этом направлении.

Ключевые слова: хронический панкреатит, генетическая предрасположенность, метаболизм этанола.

Introduction

Problem of chronic pancreatitis (CP) is one of the most complex ones in medicine and particularly in gastroenterology. Frequency of CP in the world has doubled in the past 30 years, diagnostics and treatment being difficult for general practitioners. CP represents itself a serious medico-social problem, predominantly able-bodied population suffering from this disease while it leads to the decreasing quality of patients' life, partial or full loss of working capacity [5].

Except main etiological factors of CP (alcohol abuse, biliary pathology), special attention has been recently paid to the genetic predisposition. Since active trypsin has the potential of driving the pancreatic digestive enzyme activation cascade, number of mechanisms are engaged in protection of the pancreas and body from autodigestion. There's an occurrence of breach in the protection of acinar cells due to the genetic mutations [1].

It was defined less than a decade ago that the hereditary pancreatitis was a rare pathology of the pancreas, clinically characterized by recurrent episodes of acute pancreatitis in the form of abdominal pain and dyspeptic syndromes, gradually increasing frequency and severity of relapses, increasing degree of functional (exocrine and/or endocrine) pancreatic insufficiency, burdened familial history, high risk of pancreatic cancer. Now it should be admitted that a wide range of possible associations of geno- and phenotype of hereditary pancreatitis may vary from direct autosomal dominant traits of the disease with nearly complete penetrance (dominant cationic trypsinogen (PRSS1) gene mutation) through mild genetic risk factors without evidence of Mendelian inheritance (pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations) to subtle hereditary disease modifiers that can be identified only in complex studies (genetic mutations in chymotrypsin C, anionic trypsinogen (PRSS2), etc.). Thus, identification of mutations in different genes, particularly in PRSS1, PRSS2, SPINK1, keratin, etc., has changed the understanding of CP pathophysiology, to some extent having determined the significance of influence of environmental factors on the degree of penetrance of hereditary pancreatitis, severity of its clinical symptoms and age of onset [1, 3].

Nowadays alcohol and drug addiction are considered to be the most acute socially significant