

FRECVENȚA MUTAȚIILOR GENEI CFTR LA PACIENȚII CU PANCREATITĂ CRONICĂ DIN REPUBLICA MOLDOVA

Rodica Bugai

Catedra Medicină Internă nr. 3 USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

The frequency of CFTR gene mutations in chronic pancreatitis patients of the Republic of Moldova

Over the past two decades it has been shown that chronic pancreatitis is a variable part of cystic fibrosis syndrome caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR). The aim of this study was to assess the frequency of CFTR gene mutations in patients with chronic pancreatitis of the Republic of Moldova. The results indicated the presence of mutant alleles of CFTR in 70% of patients, 23.3% homozygous and 46.4% heterozygous and 60% in healthy individuals, of whom - 3 (10%) homozygous and 15 (50%) heterozygous, and demonstrate the importance of these mutations in genetic susceptibility to chronic pancreatitis in the population of RM in correlation with other risk factors.

Rezumat

Pe parcursul ultimelor două decenii a fost demonstrat că pancreatita cronică reprezintă o parte variabilă a sindromului de fibroză chistică, cauzat de mutații în gena ce codifică regulatorul de conducere transmembranar al fibrozei chistice (CFTR). Scopul acestui studiu l-a constituit evaluarea frecvenței mutațiilor genei CFTR la pacienții cu pancreatită cronică din Republica Moldova. Rezultatele au relevat prezența alelelor mutante ale CFTR la 70% pacienți, 23,3% homozigoți și 46,4% heterozigoți și la 60% persoane sănătoase, dintre ei - 3 (10%) homozigoți și 15 (50%) heterozigoți și denotă importanța acestor mutații în susceptibilitatea genetică pentru pancreatită cronică la populația din RM în corelație cu alți factori de risc.

Actualitatea

Pancreatita cronică reprezintă o parte variabilă a sindromului de fibroză chistică, cauzat de mutații în gena ce codifică regulatorul de conducere transmembranar al fibrozei chistice CFTR [18]. Multiple studii au remarcat o prevalență înaltă a mutațiilor CFTR la pacienții cu PC de diferită etiologie.

Fibroza chistică este o tulburare autosomal recisivă, cu o incidență de cca 1:2500 născuți – vii. În 1989 CFTR a fost identificată ca genă de bază, iar în 1998 Sharer și colegii și Cohn și colegii au prezentat o asociere de mutații CFTR cu pancreatita cronică [5,16]. Varietatea de tulburări pancreatice în mutațiile acestei gene diferă de la pierderea completă a funcției pancreatice până la o funcție pancreatică normală.

Gena ce codifică CFTR este localizată pe brațul lung al cromosomului 7:7q31, se întinde pe cca 250 Kb și conține 27 exoni de la perechea de baze 116,907,253 la perechea de baze 117,095,955 [15]. CFTR codifică o proteină transmembranară de pe suprafața majorității celulelor epiteliale și funcționează ca un canal AMF-ciclic, ce permite trecerea anumitor anioni prin peretele celular (eg. Cl-) datorită gradientului lor electrochimic [17].

De regulă, CFTR se găsește în celulele epiteliale ale multor organe, inclusiv pulmonii, ficat, pancreas, tractul digestiv, organele reproductive, piele. În mod normal, proteina CFTR conduce clorurile și tiocinatele, încărcate negativ, în afara celulei epiteliale. În rezultat se formează un gradient electric și ionii de sodiu, încărcăți pozitiv, se mișcă în aceiaș direcție ca clorura printr-o cale paracelulară. Din cauza acestei mișcări, potențialul lichid al mucusului este redus. Aceasta rezultă în ieșirea apei din celulă prin osmoză și formarea unui mucus mai lichid [11]. CFTR transportă atât clorurile, cât și bicarbonații și este esențial pentru secreția normală de către celulele pancreatice a bicarbonaților, care au un rol protectiv în drenarea secreției

pancreatice; în apariția mutațiilor are loc reducerea fluxului de lichid pancreatic cu hiperconcentrare de proteine și blocare a ducturilor [20].

La momentul actual sunt cunoscute mai mult de 1700 de mutații ale CFTR, dar majoritatea dintre ele nu sunt asociate cu fibroza chistică. Aceste mutații pot fi divizate în 6 clase, bazate pe consecințele funcționale ale polimorfismului asupra funcției de canal: clasele I-III sunt considerate severe, clasa IV-VI de variabilitate ușoară [8]. În fibroza chistică, mutația cea mai frecventă este F508del, reprezentând aproximativ 66% din toate alelele mutante [19]. Se presupune că pacienții cu PC izolată, în absența altor manifestări clinice ale fibrozei chistice, ar putea fi purtători ai mutațiilor mai ușoare, clasa V-VI, în cel puțin o alelă. La secvențierea completă a ADN 60% din pacienți au fost diagnosticați cu mutații CFTR [2,13].

Prezintă interes faptul, că evoluția clinică a fibrozei chistice poate fi variabilă la pacienții care poartă aceleași mutații, indicând influența factorilor de mediu și, poate, alte modificări genetice. Până în prezent nu sunt cunoscute toate mecanismele care stau la baza dezvoltării pancreatitei cronice în mutațiile genei CFTR. Studiarea patologiilor asociate cu mutațiile CFTR este limitată de imposibilitatea investigării complete a secvenței genomice a genei CFTR pe loturi mari de pacienți, deoarece această genă codifică 1480 aminoacizi.

În 2 studii, care au analizat secvențierea completă a CFTR și mutațiile PRSS1 și SPINK1 în PC, au fost depistați 25% și 30% de purtători a cel puțin o mutație CFTR și câțiva au fost determinați ca fiind heterozigoți pentru diferite mutații CFTR sau trans- heterozigoți pentru o mutație CFTR și o mutație SPINK1 sau PRSS1 [1,13]. Tot în aceste studii s-a demonstrat că pacienții cu pancreatită idiopatică au o probabilitate de 4-6 ori mai mare de a fi purtători de mutații CFTR, comparativ cu populația generală, iar pacienții heterozigoți au un risc de 40 ori mai mare pentru pancreatită [13]. Îmbinarea de 2 mutații CFTR și mutația N34S a inhibitorului pancreatic de tripsină (SPINK1) crește riscul pentru pancreatite de 900 ori [7].

Asocierea mutațiilor CFTR cu pancreatitele alcoolice este incertă, fiind absentă în unele studii [10,16], și prezentă în 23-40 % din pacienții Italiani [14], Spanioli [4] și Japonezi [9]. Casals și coautorii [4] au presupus că există un spectru diferit de mutații CFTR la pacienții cu PC alcoolică vs pacienții cu PC idiopatică. Merită menționat faptul că în populația japoneză frecvența fibrozei chistice este cu mult mai rară decât în țările vestice-1/350 000 vs 1/2500, iar într-un studiu pilot, efectuat în Japonia prin investigarea testului de transpirație pe deget, s-a determinat prezența disfuncțiilor genei CFTR la 52 % pacienți cu PC (21 alcoolică și 4 idiopatică) vs 16 % control [12].

50 % din pacienții cu PC idiopatică instalată precoce au mutații SPINK1 sau CFTR [6].

Studiile efectuate până în prezent au demonstrat că mutațiile CFTR singure nu sunt suficiente pentru patogeneza PC la majoritatea pacienților și sunt necesare studii suplimentare pentru a elucida rolul CFTR în patogeneza PC [3].

Scopul

Evaluarea frecvenței mutațiilor genei CFTR la pacienții cu pancreatită cronică din Republica Moldova.

Material și metode

Studiul a inclus 30 pacienți cu PC cu vârsta 27-55 ani, dintre ei: 20-cu PC cu recidive, bărbați/femei-12/8 (grupul A), 5-cu PC pseudotumorală, bărbați/femei-4/1 (grupul B) și 5 -cu PC formă latentă, bărbați/femei- 2/3 (grupul C). 30 persoane practic sănătoase au format grupul de control. Argumentarea diagnosticului de PC s-a efectuat în baza datelor anamnestice, clinice și paraclinice (hemoleucograma; α -amilazei urinei; analiza biochimică a sângelui: glucoza, α -amilaza, lipaza, proteina totală, albumina, bilirubina, GGTP, FA, Ca; coprograma; elastaza-1 în materiile fecale; ecografia transabdominală; CT abdominal, ERCP). Ca specimen pentru determinarea polimorfismului genei SPINK1 a fost folosit sângele venos, cu utilizarea metodei

de polimerizare în lanț (PCR) și a primer-ilor corespunzători, în laboratorul Institutului de Genetică al AȘ RM. Acordul informat a fost obținut de la toate persoanele incluse în studiu.

Rezultate și discuții

Rezultatele studiului au relevat prezența alelelor mutante ale CFTR la 21 (70%) pacienți, 23,3% homozigoți și 46,4% heterozigoți. Referitor la repartizarea pe grupe am obținut următoarele rezultate: 80% în grupul A - 6 homozigoți (30%) și 10 heterozigoți (50%), 40% în grupul B- 1 homozigot și 1 heterozigoți, și la 60 % în gr. C - 3 heterozigoți.

Evaluarea grupului de control a demonstrat prezența alelelor mutante ale CFTR la 18 (60%) persoane, dintre ei- 3 (10%) homozigoți și 15 (50%) heterozigoți.

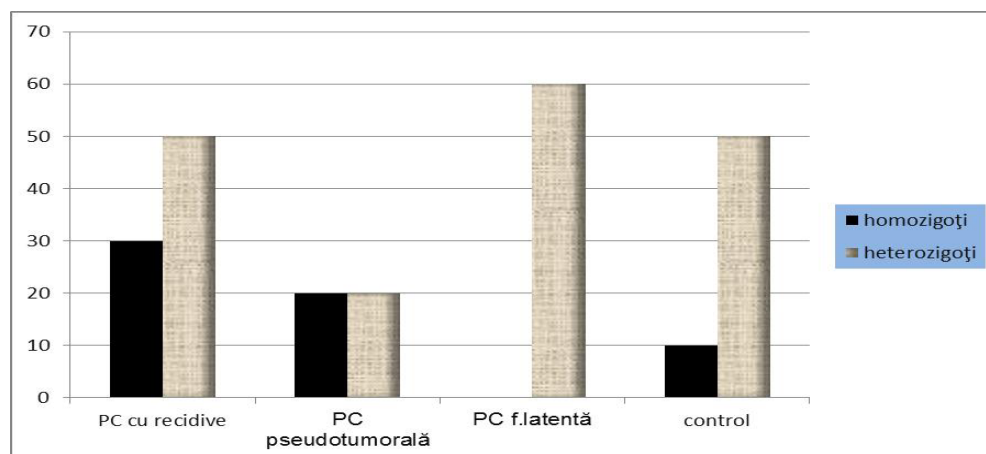


Figura 1. Prezența alelelor mutante ale genei CFTR la pacienții cu pancreatită cronică și grupul de control

Conform datelor din literatură pacienții heterozigoți au un risc de 40 ori mai mare pentru pancreatită [13].

Este posibil, ca în următorii ani mai multe patologii să fie definite ca fiind rezultatul secreției inadecvate de ioni prin celulele epiteliale și să fie atribuite mutațiilor CFTR. Nu se exclude că mutațiile CFTR predispun unii pacienți către PC atunci când sunt expuși unor factori de mediu toxici sau „sociali”, așa cum este de ex. consumul de alcool, sau atunci când sunt asociate cu alte gene modificate, care nu au fost deocamdată identificate.

Concluzii

1. Studiul efectuat pe populația heterogenă a Republicii Moldova demonstrează frecvența înaltă a alelelor mutante în gena ce codifică CFTR la pacienții cu pancreatită cronică și necesită studiere de perspectivă.

2. Evaluarea mai amplă a corelației riscului genetic și a factorilor de mediu ar putea identifica indivizii cu o probabilitate înaltă de dezvoltare a pancreatitei cronice, fapt ce ar putea permite prevenirea, diagnosticarea precoce și reducerea riscurilor acestei patologii.

Bibliografie

1. Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C et al. Determination of the relative contribution of three genes- the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. Eur J Hum genet, 2002; 10:100-6.

2. Bishop MD, Freedman SD, Zielenski J, et al. Does complete DNA analysis identify a higher percentage of cystic fibrosis mutations in patients with idiopathic chronic and recurrent acute pancreatitis? Gastroenterology 1999; 116:A1113.

3. Bödeker H, Mössner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orfanet J Rare Dis.* 2007; 2:1 doi:10.1186/1750-1172-2-1.
4. Casals T, Aparisi L, Martinez-costa C, et al. Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis? *Pancreas* 2004; 28:374-379.
5. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *New Engl J Med.* 1998;339:653–658. doi: 10.1056/NEJM199809033391002. [PubMed]
6. DiMigno MJ, DiMiagno EP. Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastro* 2005;21/5:544-554.
7. Grendell JH. Genetic factors in pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5:105-109.
8. Grigorescu M., Grigorescu MD. Genetic factors in pancreatitis. *Romanian Journal of Gastroenterology.* March 2005, Vol. 14.No.1, 53-61.
9. Fujiki K, Ishiguro H, Suzuki Y, et al. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41:e55.
10. Malats N, Gasals T, Porta M, et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)delta F508 mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Gut* 2001;48:70-74.
11. Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, Zabner J, McCray PB, Nauseef WM, Dupuy C, Bánfi B (January 2007). A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175** (2): 174–83. doi:10.1164/rccm.200607-1029OC. PMC 2720149. PMID 17082494
12. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Z, et al. A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004;28:80-85.
13. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, et al. Cystic Fibrosis Gene Mutations and Pancreatitis Risk: Relation to Epithelial Ion Transport and Trypsin Inhibitor Gene Mutations. *Gastroenterology* 2001; 121:1310-1319.
14. Pezzilli R, Morselli-Laba AM, Mantovani V, et al. Mutations of the CFTR gene in pancreatic disease. *Pancreas* 2003;27:332-336.
15. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N . "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping". *Science* 1989 245 (4922): 1059–65. doi:10.1126/science.2772657. PMID 2772657.
16. Sharer N, Schwartz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *New Engl J.*1998; 339:645652.doi:10.1056/NEJM199809033391001. [PubMed]
17. Sheppard DN, Welsh MJ (January 1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79 (1 Suppl): S23–45. PMID 9922375.
18. Teich N, Mössner J. Genetic aspects of chronic pancreatitis. *Med Sci Monit,* 2004;10 (12): RA325-328 [PubMed].
19. The Cystic Fibrosis Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat.*1994;4:167-177.
20. Whitcomb DC. Mechanisms of disease: advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:46-52.