

EXPRESIA MUTAȚIEI N34S A GENEI
INHIBITORULUI PANCREATIC DE SECREȚIE
A TRIPSINEI LA PACIENȚII CU PANCREATITĂ
CRONICĂ DIN REPUBLICA MOLDOVA

Rodica BUGAI,
USMF Nicolae Testemițanu,
Departamentul Medicină Internă

Summary

The expression of N34S mutation in pancreatic secretory trypsin inhibitor gene in the patients with chronic pancreatitis from the Republic of Moldova

In normal acinar cells, trypsin activity is properly suppressed by SPINK1, that acts as the first line of defence against prematurely activated trypsinogen. Study subjects were 100 patients with chronic pancreatitis (CP) and 100 healthy people. The N34S/SPINK1 mutation was determined in the venous blood by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) reaction. The study demonstrated the high N34S mutation presence in the population of RM, mainly in CP patients, most commonly in the pseudotumoral form of CP, in homozygous. The people with the mutation N34S/SPINK1 in a homozygous form have a 5.47 times higher risk of developing CP.

Keywords: chronic pancreatitis, N34S/SPINK1

Резюме

Экспрессия мутации N34S гена ингибитора панкреатического секреторного трипсина у больных с хроническим панкреатитом в Республике Молдова

В нормальных ацинарных клетках поджелудочной железы активность трипсина должным образом подавляется SPINK1, который выступает в качестве первой линии защиты от преждевременного активирования трипсиногена. Были обследованы 100 больных с хроническим панкреатитом и 100 здоровых людей. Мутацию N34S / SPINK1 определяли в венозной крови с помощью RFLP реакции. Исследование показало высокую частоту мутации N34S у населения Р. Молдова, в основном у больных с ХП, чаще всего в псевдотуморальной форме ХП, в гомозиготном состоянии мутации. У людей с мутацией N34S / SPINK1 в гомозиготной форме риск развития ХП в 5,47 раз выше чем у тех у кого нет этой мутации.

Ключевые слова: хронический панкреатит, N34S/SPINK1

Introducere

Mutațiile genice, în lumina progreselor științifice obținute, dețin unul din rolurile de bază în dezvoltarea și progresarea afecțiunilor pancreatice, inclusiv a pancreatitei cronice (PC). Inhibitorul pancreatic de secreție a tripsinei, care este cunoscut și ca inhibito-

rul proteazei serinice tip 1 Kazal (SPINK1 – Serine Proteaze Inhibitor Kazal type 1) este o peptidă sintetizată de celulele pancreatice, care colocalizează cu tripsinogenul în granulele zimogene, inhibând activarea prematură a tripsinogenului prin blocarea site-ului activ al acestuia. Primele date referitor la rolul mutațiilor SPINK1 în instalarea PC au fost raportate în anul 2000 de către Witt H. și coaut. [11], confirmate ulterior prin numeroase studii. Gena ce codifică SPINK1 este situată pe brațul lung al cromozomului 5:5q32, are o lungime de aproximativ 7,5 Kb, 4 exoni și 3 introni [Hirota M. ș.a., 2006], fiind o polipeptidă alcătuită din 79 de aminoacizi (AF286028), care formează două compartimente. Primul este constituit din 56 de aminoacizi și conține trei legături disulfidice și un site de legătură tripsin-specific, format din Lyz-Ile; al doilea compartiment este o peptidă de semnalizare, ce conține 23 de aminoacizi [9].

Deoarece raportul SPINK1/trypsinogen este de 1/20, SPINK1 poate bloca doar 20% din activitatea tripsinei. În situația când cantitatea sau activitatea SPINK1 este redusă, tripsinogenul se poate activa prematur în tripsină, cu activarea ulterioară a altor enzime, cu autolizarea țesutului pancreatic, afectarea celulelor acinare și dezvoltarea pancreatitei [Hirota M. ș.a., 2006; Neoptolemos J. ș.a., 2000]. În cazul mutației R122H a tripsinogenului cationic PRSS1, tripsina și enzimele asemănătoare tripsinei devin inapte de a liza moleculele de tripsinogen și tripsină, astfel SPINK1 devine unicul mecanism de inactivare.

La bolnavii cu pancreatită ereditară (PE), SPINK1 continuă să activeze în regim obișnuit, dar capacitatea sa de blocare devine cert insuficientă și la acțiunea unui factor provocator (de ex., alcoolul), este posibilă activarea în exces a tripsinogenului în tripsină, care nu poate fi inactivată. Astfel, continuă activarea în cascadă a enzimelor pancreatice și autodistrugerea pancreasului, cu progresarea PC. Pentru dezvoltarea exacerbării de pancreatită este de ajuns ca aproximativ 50% din moleculele tripsinogenului și a tripsinei să fie rezistente la hidroliză [Chen J.M. ș.a., 2001]

Există câteva mutații ale SPINK1, cea mai frecventă fiind N34S (c.101A>G), ce reprezintă substituția asparaginei cu serina în codonul 34. Mutația N34S a fost depistată preponderent la pacienții fără anamnestic familial de PC. În PE, N34S a fost decelată la 13% din pacienții cu PC [Pfützer R.H. ș.a., 2000]. În PCI instalate devreme, N34S a fost estimată în una sau în ambele alele la 9,1-40% [Chen J.M. ș.a., 2000; Drenth J.P.H. ș.a., 2001; Pfützer R.H. ș.a., 2000; Wang W. ș.a., 2009, 6], iar în cele alcoolice – la 12-15% din pacienți [Drenth J.P.H. ș.a., 2001; Keim V., 2005; Pfützer R.H. ș.a., 2005, Truningher K. ș.a., 2001].

În rândul pacienților brazilieni cu PC, 1% au fost diagnosticați cu mutații SPINK1 [Bernardino A.L. ș.a., 2003]. Mutația N34S SPINK1 este autosomal-recisivă, având un rol modificator în dezvoltarea PC [Whitcomb D.C., 2004]. Incidența mutației N34S este de aproximativ 1-4% în populația generală [1, 6], dintre care aproximativ 1% este heterozigotă pentru N34S [11] și mai puțin de 1% din purtători dezvoltă pancreatite. Frecvența mutației N34S este considerabil mai mare în rândul pacienților care dezvoltă pancreatite decât la cei sănătoși, iar rata asociației pancreatitei este mai mare în tipul homozigot al mutației N34S [Pfützer R.H. ș.a., 2000; Hirota M. ș.a., 2006]; N34S este mai frecventă în populația țărilor vestice [10]. Aceste mutații se întâlnesc mai des la pacienții cauzieni cu PC. Mutația SPINK1/N34S predispune la instalarea timpurie a PI și la apariția mai frecventă a recidivelor de pancreatită, care ar putea duce în final la insuficiența pancreatică [8].

A fost demonstrat faptul că mutațiile genei SPINK1 diminuează pragul de dezvoltare a PC în prezența altor factori genetici și ambientali, singure nefiind în stare să dezvolte PC, în pofida faptului că conferă o susceptibilitate severă genetică față de PC [5].

Material și metode

Au fost supuși studiului 100 de pacienți cu PC, b/f-55/45, vârsta medie de 47.02 ± 0.93 ani, inclusiv cu: PC cu recidive (PCR) – 41, PC pseudotumoroasă (PCPsT) – 21, PC latentă (PCL) – 38 și grupul de control (GC) – 100 de persoane practic sănătoase, b/f-56/44, vârsta medie – 23.23 ± 0.49 ani, Diagnosticul de PC a fost argumentat prin metode clinice și paraclinice, conform PCN. Mutația N34S (PRSS1) a fost determinată în Laboratorul de Genetică Moleculară al Institutului de Genetică al AȘM, ca specimen biologic fiind folosit sângele venos; polimorfismul genetic a fost identificat prin metoda de analiză a lungimii fragmentelor amplificate și a fragmentelor polimorfe de restricție (restriction fragment length polymorphism, RFLP), cu utilizarea primer-ilor: forward N34S 5'- AACCAGGGAGATCTGTGATA-3 și revers N34S 5'- GTCAGCCACATCAAT AGAGG-3. Pentru prelucrarea statistică s-au folosit metode de analiză variațională, descriptivă, prin utilizarea tabelor de contingență, a criteriului χ^2 Pearson și Fisher, riscul relativ estimat (OR) în intervalul de confidență (CI) 95% s-a apreciat prin utilizarea sistemului de modelare parametrică.

Rezultate și discuții

Studiul a demonstrat prezența mutației N34S/SPINK1 la 74 (74%) persoane sănătoase și la 78 (78%) pacienți cu PC, fără o diferență statistic semnificativă, $\chi^2=0.44$, $p>0.05$.

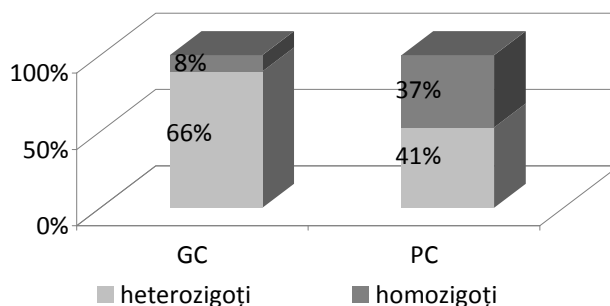


Figura 1. Frecvența mutației N34S (SPINK1) la pacienții cu PC versus GC, la homozigoți și heterozigoți

Distribuția modificărilor genice studiate în funcție de prezența lor la heterozigoți și homozigoți a evocat prezența într-un număr mai mare a variantei homozigote la pacienții cu PC vs GC (figura 1), cu o diferență statistic semnificativă: mutația N34S (SPINK1) – la 41 (41%) pacienți heterozigoți și 37 (37%) homozigoți versus GC-66 (66%) heterozigoți și 8 (8%) homozigoți, $\chi^2=24,86$, $p<0,001$.

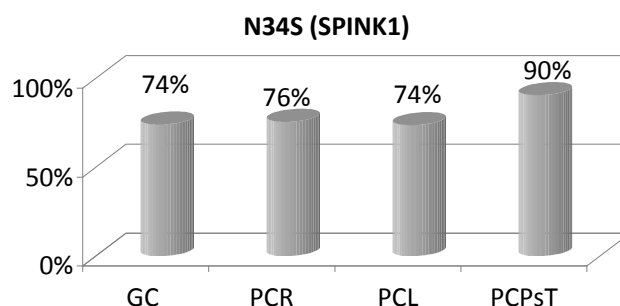


Figura 2. Frecvența mutației N34S (SPINK1) la pacienții cu diferite forme clinice de PC versus GC

Mutația genei SPINK1 (figura 2) s-a decelat preponderent la bolnavii cu PCPsT (90,48%) vs PCR (75,61%) și PCL (73,68%), $\chi^2=4.00$, $p>0.05$ (figura 2).

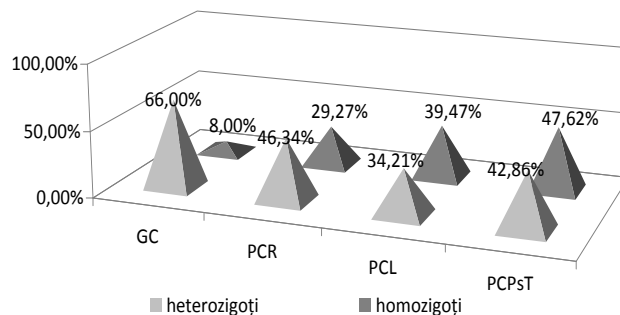


Figura 3. Frecvența mutației N34S (SPINK1) la homozigoți și heterozigoți în rândul pacienților cu diferite forme clinice de PC versus GC

Încercarea de a depista frecvența mutației N34S (SPINK1) în formă homozigotă și heterozigotă la pacienții cu diferite forme clinice de PC (figura 3) a demonstrat următoarele rezultate: forma heterozigotă a fost întâlnită cel mai des la pacienții

cu PCR – la 19 (46,34%), de 1,08 ori mai frecvent *versus* PCpST și de 1,35 ori mai frecvent *vs* PCL, însă de 1,42 ori mai puțin *vs* GC, urmată de PCpST – la 9 (42,86%), de 1,54 ori mai rar *vs* GC și PCL – la 13 (34,21%), de 1,93 ori mai rar *vs* GC. În forma homozigotă a fost întâlnită cel mai des la pacienții cu PCpST – la 10 (47,62 %), de 1,21 ori mai frecvent *vs* PCL, de 1,63 ori mai fecvent *vs* PCR și de 5,95 ori mai frecvent *vs* GC, urmată de PCI – la 15 (39,47%), de 4,93 ori mai frecvent *vs* GC și PCR – la 12 (29,27%), de 3,66 ori mai frecvent *vs* GC (figura 3).

A fost determinat gradul de fenotipare a mutației N34S în funcție de prevalența în forma heterozigotă și homozigotă (vezi tabelul).

Fenotiparea mutației N34S/SPINK1 la pacienții cu PC

Indicii evaluați		Mutații abs. nr. (%)	Heterozigoți nr. (%)	Homozigoți nr. (%)	X ²	p
Sex:	bărbați	14 (63.64)	20 (48.78)	21 (56.76)	1.35	>0.05
	femei	8 (36.36)	21 (51.22)	16 (43.24)		
Debutul bolii:	acut	7 (31.82)	10 (24.34)	14 (37.84)	1.65	>0.05
	insidios	15 (68.18)	31 (75.61)	23 (62.16)		
AF de PC		7 (31.82)	22 (53.66)	23 (62.16)	5.17	>0.05
Sindrom dolo abdominal		22 (100)	41 (100)	37 (100)		>0.05
Intensitatea durerii, VAS:	ușoară	9 (40.91)	14 (34.15)	14 (37.84)	0.45	>0.05
	medie	2 (9.09)	3 (7.32)	3 (8.11)		
	severă	11 (50)	24 (58.54)	20 (54.05)		
Insuficiență:	exocrină	12 (54.55)	29 (70.73)	21 (56.76)	2.28	>0.05
	endocrină	10 (45.45)	22 (29.27)	16 (43.24)		
Insuficiența endocrină:	DTG	2 (9.09)	2 (4.88)	1 (2.70)	4.19	>0.05
	DZ tip II ID	2 (9.09)	2 (4.88)	1 (2.70)		
	DZ tip II IND	6 (27.27)	8 (19.51)	10 (27.03)		
DZ, grad severitate:	ușor	2 (9.09)	6 (14.63)	2 (5.41)	7.57	>0.05
	mediu	7 (31.82)	6 (14.63)	13 (3.14)		
	sever	0 (0)	0 (0)	1 (2.70)		

Rezultatele au confirmat unele diferențe, dar fără o semnificație statistic semnificativă: în funcție de sex, la femei a predominat forma homozigotă (56,76%), la bărbați – forma heterozigotă (51,22%); anamneza familială (AF) de PC a prevalat la pacienții homozigoți (62,16%), debutul bolii acut – la homozigoți (37,84), debut insidios – la heterozigoți (75,61%), insuficiența exocrină – la heterozigoți (70,73), insuficiența endocrină – la homozigoți (43,24%), dereglarea toleranței la glucoză (DTG) și DZ tip II ID – la heterozigoți (4,8%), DZ tip II IND – la homozigoții (27,93); DZ de severitate ușoară – la heterozigoți (14,63%), severitate medie – la homozigoți (35,14%), DZ sever – la homozigoți (2,70%). Studiul lui Cichoż-Lach H. și coaut. a dovedit prezența mutației N34S mai frecvent la bărbați decât la femei, fără o diferență statistic semnificativă a debutului bolii la pacienții cu și fără mutația N34S [2].

Sindromul dolo a fost prezent la toți pacienții, dar cu un grad de manifestare diferit, apreciat conform scalei analogice vizuale (VAS): un grad mai înalt s-a atestat la heterozigoți (66,73%), $F=1.64$, $p>0,05$; durerea severă a predominat la toți pacienții, cu preponderență la heterozigoți (58,54%), dar fără o diferență statistic semnificativă. Vârsta de debut a bolii a fost mai mică la pacienții cu mutația N34S forma homozigotă ($30,05\pm 1,53$ ani) *vs* forma heterozigotă ($32,34\pm 1,36$ ani), $F=1.03$, $p>0.05$.

Analiza riscului relativ estimat în intervalul de confidență 95% pentru mutația N34S a relevat un risc mai mare de a dezvolta PC la persoanele care au mutația respectivă în varianta homozigotă *vs* cea heterozigotă, cu următoarele rezultate: homozigoți – $OR=5.47$, 95% CI (1,93-15,94), $\chi^2=11.74$, $p=0.001$.

Pentru varianta heterozigotă a mutației N34S (SPINK1), riscul relativ nu are valoare ($OR=0.73$, 95% CI=0.348-1.547), deoarece nu există diferențe statistice semnificative între lotul de pacienți cu PC și lotul-martor ($p>0.05$). Conform datelor din literatură, prezența mutației N34S/SPINK1 crește riscul de PC de 10-15-20 de ori [1, 7, 12]. Riscul de a dezvolta PC la purtătorii variantei heterozigote a N34S este de 10 ori mai mare, iar în varianta homozigotă acest risc se dublează [4].

Un studiu pe polonezi a depistat prezența mutației N34S la 6,5% din cei sănătoși [3]. Witt și coaut. [11] au confirmat prezența mutației N34S la 6% homozigoți cu PC și la 3% sănătoși. Este de menționat că unele studii nu au depistat prezența mutației N34S la homozigoți în rândul populației de control [1,7]. Un studiu efectuat de Pfizer R. ș.a. în 2000 a demonstrat că prezența mutației N34S/SPINK1 preponderent în formă homozigotă, dar și heterozigotă într-un număr mai mic provoacă pancreatită acută recurentă și PC familială.

Analiza genelor implicate în PC în populația franceză a arătat prezența mutației N34S la 9,1% de heterozigoți și 5,6% homozigoți [4] și cca 2,6% homozigoți în studiul lui Rosendahl I. Prevalența mutației N34S/SPINK1 la pacienții cu PC în studiul efectuat de Sandhu B. și coaut. [8] a fost de 5,4% și de cca 37,1% la bolnavii cu PI. O metaanaliză a

mutației N34S/SPINK1 în 14 studii a depistat o frecvență de la 9,1 la 24,7% [1]. Cea mai înaltă rată a mutației N34S (SPINK1) a fost remarcată la pacienții cu PCI din India – 46% [Chandak G.R. ș.a., 2002]. Alt studiu a dovedit prezența mutației N34S mai frecvent la bărbați decât la femei, fără o diferență statistic semnificativă a debutului bolii la pacienții cu și fără mutația N34S [2].

Există ipoteza că alela N34S/SPINK1 acționează ca un modificador al expresiei fenotipice a PC, iar în acest caz, la heterozigoții cu N34S/SPINK1 se cere prezența altor mutații genice pentru a dezvolta PC.

Concluzii

1. Studiul efectuat a demonstrat prezența mutației N34S într-un număr mare la populația eterogenă a R. Moldova, preponderent la pacienții cu PC (78% versus 74% GC), mai frecvent în formă pseudotumorală (90,48%).

2. Forma homozigotă a mutației N34S prevalează la bolnavii cu PC versus GC, cu o diferență statistic semnificativă.

3. Expresia fenotipică a mutației N34S nu depinde de forma homozigotă sau heterozigotă, diferențele evidențiate nu au fost statistic semnificative.

4. Persoanele care au mutația N34S/SPINK1 în forma homozigotă au un risc relativ estimat de 5,47 ori mai mare de a dezvolta PC decât persoanele care nu au mutația respectivă.

Bibliografie

1. Aoun E., Chang C.C., Greer J.B. et al. *Pathways to injury in chronic pancreatitis: decoding the role of the high-risk SPINK1 N34S haplotype using meta-analysis*. In: PLoS One, 2008; nr. 3(4), p. e2003.
2. Cichoż-Lach H., Michalak M., Lis M. et al. *The NS34 mutation of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) gene and alcoholic chronic pancreatitis*. 2012, nr. 122(6), p. 277-283.
3. Gasiorowska A., Talar-Wojnarowska R., Czupryniak L. et al. *The prevalence of Cationic Tripsinogen (PRSS1) and Serine Pro-tease 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.
4. Masson E.J.M., Chen Audrézet M.-P., Cooper D.N., Férec C. *A Conservative Assessment of the Major Genetic Causes of Idiopathic Chronic Pancreatitis: Data from a Comprehensive Analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR Genes in 253 Young French Patients*. In: PLoS One, 2013; nr. 8(8), p. e73522.
5. Midha S., Khajuria R., Shastri S., Kabra M., Garg P.K. *Idiopathic chronic pancreatitis in India: phenotypic characterisation and strong genetic susceptibility due to SPINK1 and CFTR gene mutations*. In: Gut., 2010; nr. 59, p. 800-807.
6. Pelaez-Luna M., Robles-Diaz G., Canizales-Quinteros S., Tusié-Luna M.T. *PRSS1 and SPINK1 mutations in idiopathic chronic and recurrent acute pancreatitis*.

In: World J. Gastroenterol., Sep 7, 2014; nr. 20(33), p. 11788-11792.

7. Rosendahl J., Landt O., Bernadova J. et al. *CFTR, SPINK1, CTSC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated?* In: Gut, 2013, nr. 62, p. 582-592.
8. Sandhu B., Vitazka P., Ferreira-Gonzalez A. et al. *Presence of SPINK-1 variant alters the course of chronic pancreatitis*. In: J. Gastroenterol. Hepatol., 2011, Jun; nr. 26(6), p. 965-969.
9. Wang G.P., Xu C.S. *Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor*. In: World J. Gastrointest. Pathophysiol., 2010, June 15; nr. 1(2), p. 85-90.
10. Wang W., Sun X.T., Weng X.L. et al. *Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTSC and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study*. In: BMJ Open, 2013; nr. 3(9), p. e003150.
11. 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. 2716-17.
12. Muniraj T., Aslanian H., Farrell J., Jamidar P. *Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: Epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology and clinical features*. In: Disease - a-month, vol. 60, issue 12, december 2014, p. 530-550.

Rodica Bugai, asist. univ.,
Disciplina Medicină Internă,
Departamentul de Medicină Internă,
USMF Nicolae Testemițanu,
Tel.: 069762166,
E-mail: rodica.bugai@usmf.md

DEPENDENȚA HEMODINAMICII DE INDICII SECRETIEI GASTRICE ȘI MOTILITĂȚII GASTRODUODENALE ÎN ULCEROGENEZĂ

Eugen COBÎLEANSCHII,
USMF Nicolae Testemițanu, Clinica medicală nr. 6

Summary

Dependence on hemodynamic parameters of gastric secretion and motility in the development of gastroduodenal ulcer disease

Patients suffering from peptic ulcer disease marked hemodynamic changes are characterized by a decrease in systolic and stroke volumes, an increase in total peripheral vascular resistance. Hemodynamic changes are directly dependent on the phenomenon duodenostasis with severe hyperacidity, which in turn reduces the ability to regenerate the epithelium leads to the predominance of factors of aggression of defense mechanisms – there is ulceration.

Keywords: ulcer, circulatory dynamics, Doppler, hyperchlorhydria, hypomotility