

ESTIMAREA POLIMORFISMULUI
GENELOR PRSS1, SPINK1, CFTR LA PACIENȚII
CU PANCREATITĂ CRONICĂ
PSEUDOTUMORALĂ DIN REPUBLICA MOLDOVA

Rodica BUGAI,

Departamentul Medicină Internă,
Clinica medicală nr. 7, USMF Nicolae Testemițanu

Summary

The estimation of PRSS1, SPINK1, CFTR genes polymorphism in pseudotumoral chronic pancreatitis patients of the Republic of Moldova

The objective of the study was to assess the incidence of some genetic, environmental and metabolic risk factors in patients with pseudotumoral chronic pancreatitis (CP) from Republic of Moldova. The study included 21 patients with pseudotumoral CP and 100 healthy people. The polymorphism of PRSS1, PSTI/ SPINK1, CFTR genes was determined; venous blood was used as a sample, with the use of the polymerase chain method (PCR) and of corresponding primers, in the Laboratory of the Institute of Genetics of the Academy of Sciences of Republic of Moldova. The presence of mutant alleles of the PRSS1 gene has been determined in 15 (71.42%) pts – 11 (73.3%) heterozygous and 4 (26.66%) homozygous; of the SPINK1 gene in 19 (90.47%) patients – 9 (47.36%) heterozygous and 10 (52.63%) homozygous; of the CFTR gene in 17 (80.95%) pts – 12 (70.58%) heterozygous, 5 (29.41%) homozygous in the group of the patients with a pseudotumoral CP, in association with other risk factors. Genetic and environmental risk assessment may help identify individuals who are likely to develop severe chronic pancreatitis early in the disease course, and allow targeted attention to reduce confounding risks and slow the frequency, complications and prevent this disease in the future.

Keywords: chronic pseudotumoral pancreatitis, PRSS1, SPINK1, CFTR

Резюме

Оценка полиморфизма генов PRSS1, SPINK1, CFTR у больных с хроническим псевдотуморальным панкреатитом в Республике Молдова

Целью исследования была оценка частоты некоторых генетических, внешних и метаболических факторов риска у пациентов с псевдотуморальным хроническим панкреатитом (ХП) в Республике Молдова. Было обследовано 21 больных с псевдотуморальным ХП и 100 здоровых людей. Был определен полиморфизм генов PRSS1, PSTI/ SPINK1, CFTR в венозной крови методом полимеразной цепной реакции и соответствующих праймеров, в лаборатории Института генетики АН РМ. В группе больных с псевдотуморальным ХП наличие мутантных аллелей гена PRSS1 было определено у 15

(71,42%) пациентов – 11 (73,3%) гетерозиготных и 4 (26,66%) гомозиготных; гена SPINK1 – у 19 (90,47%) пациентов, 9 (47,36%) гетерозиготных и 10 (52,63%) гомозиготных, и гена CFTR – у 17 (80,95%), 12 (70,58%) гетерозиготных и 5 (29,41%) гомозиготных в сочетании с другими факторами риска. Оценка риска генетических, внешних и метаболических факторов позволяет выявить лица, склонные к развитию тяжелого хронического панкреатита на ранних стадиях заболевания и целенаправленно уделять внимание уменьшению действия губительных факторов риска и снижению частоты осложнений или предотвращению этой проблемы в будущем.

Ключевые слова: хронический псевдотуморальный панкреатит, PRSS1, SPINK1, CFTR

Introducere

Pancreatita cronică (PC) este o maladie cu potențial evolutiv sever, din cauza caracterului durerii care afectează calitatea vieții și a posibilității apariției insuficienței exo- și endocrine. Identificarea mutațiilor specifice ale genei ce codifică tripsinogenul cationic PRSS1, genei inhibitorului pancreatic de tripsină PSTI/SPINK1 și genei ce codifică proteina reglatoare transmembranică a fibrozei chistice CFTR a deschis noi posibilități în perceperea mecanismelor patogenice complexe ale acestei patologii și în elaborarea unor strategii noi de identificare a persoanelor susceptibile pentru pancreatita cronică, tratament și profilaxie [1, 17].

În 1996, Whitcomb D.C. și coaut. [18], confirmat de Férec C. și coaut. [6], au descoperit prima mutație a tripsinogenului cationic PRSS1 – R122H, a doua mutație – N21I – a fost localizată în 1997. Identificarea acestor mutații asociate cu pancreatita a demonstrat că tripsinogenului îi revine rolul principal în patogeneza pancreatitei umane. Ele sunt cauza dezvoltării rezistenței tripsinogenului la hidroliză, autoactivării necontrolate în cascadă a tripsinogenului, cu activarea ulterioară de către ultimul a altor proenzime și autoliza țesutului pancreatic. Se presupune că mutația N29I contribuie la autoactivarea tripsinogenului, dereglând interrelația cu inhibitorul pancreatic de secreție a tripsinei [3] sau împiedică inactivarea tripsinei, modificând accesibilitatea sectorului inițial al hidrolizei sale. Mutațiile R122H 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. [16]. 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 plămâni, ficat, rinichi, ovare, glande mamare. PSTI/SPINK1 este sintetizat în celulele acinare ale pancreasului, ambalat cu enzimele digestive în granule secretorii și este capabil să lege 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 tripsinei. Atunci când cantitatea sau activitatea SPINK1 este redusă, tripsinogenul se poate activa prematur în tripsină, cu activarea ulterioară a altor enzime, ce duce la afectarea celulelor acinare și dezvoltarea pancreatitei [5]. Mutațiile SPINK1 își exercită acțiunea prin diferite mecanisme: mutația M1T, care distruge codonul de start, are o rată de moștenire ereditară mai dominantă, iar mutația N34S SPINK1, care este întâlnită mai des în PC, este autosomal-recisivă.

Pancreatita cronică reprezintă o parte variabilă a sindromului de fibroză chistică, cauzat de mutații în gena ce codifică reglatorul de conducere transmembranal al fibrozei chistice CFTR. Numeroase studii au remarcat o prevalență înaltă a mutațiilor CFTR la pacienții cu PC de diferită etiologie. În 1989 CFTR a fost identificată ca genă de bază, iar în 1998 Sharer și colegii, apoi Cohn și colegii au prezentat o asociere de mutații CFTR cu pancreatita cronică [13]. Varietatea de tulburări pancreatice în mutațiile acestei gene diferă de la pierderea completă a funcției pancreatice până la o funcție pancreatică normală. La momentul actual sunt cunoscute mai mult de 1900 de mutații ale CFTR, dar majoritatea dintre ele nu sunt asociate cu fibroza chistică.

În fibroza chistică, mutația cea mai frecventă este F508del, reprezentând aproximativ 66% din toate alelele-mutant. Se presupune că pacienții cu PC izolată, în absența altor manifestări clinice ale fibrozei chistice, ar putea fi purtători ai mutațiilor mai ușoare, clasele V-VI, în cel puțin o alelă. La secvențierea completă a ADN, 60% din pacienți au fost diagnosticați cu mutații CFTR [2]. 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 de aminoacizi.

Astfel, este oportună studierea genelor implicate în dezvoltarea diferitor forme de pancreatită cronică.

Obiectivul studiului a fost evaluarea incidenței unor factori genetici de risc (PRSS1, SPINK, CFTR)

la pacienții cu PC pseudotumorală din Republica Moldova.

Materiale și metode

În studiu au fost incluși 21 de pacienți cu PC pseudotumorală din SCM Sf. Arh. Mihail (mun. Chișinău) și din SCR, cu vârsta cuprinsă între 34 și 59 de ani, 18 bărbați și 3 femei, în perioada 2009–2012, iar grupul de control a fost constituit din 100 persoane practic sănătoase, cu vârsta între 19 și 39 de ani, 56 bărbați și 44 femei. Diagnosticul a fost confirmat prin adunarea datelor anamnestice, clinice, de laborator (hemoleucograma, bilirubina, a-amilaza, lipaza, proteina totală, albumina, colesterolul, trigliceridele, glicemia, Alat, Asat, FA, GGTP, Ca seric, diastaza urinei, coprograma) și instrumentale (radiografia abdominală pe gol, ecografia transabdominală, tomografia computerizată abdominală, arteriografia abdominală prin tomografie computerizată, IMR abdominal cu regim colangiografic, CPRE, biopsia pancreatică, FEGDS, Rscopia stomacului). A fost determinat polimorfismul genelor candidate pentru dezvoltarea PC: PRSS1, PSTI/ SPINK1, CFTR, iar ca specimen 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 din RM. Acordul informat a fost obținut de la toți pacienții.

Rezultate și discuții

Studiul a demonstrat în grupul de pacienți cu PC pseudotumorală prezența alelelor-mutant ale genei PRSS1 la 15 (71.42%) – 11(73.33) heterozigoți și 4 (26.66) homozigoți; ale genei SPINK1 la 19 (90.47%) – 9 (47.36) heterozigoți și 10 (52.63) homozigoți; ale genei CFTR la 17 (80.95%) bolnavi – 12 (70.58%) heterozigoți și 5 (29.41) homozigoți. În grupul pacienților cu PC pseudotumorală la 20 (95.23) s-au determinat mutații: la 3 (14.28%) – la nivelul unei singure gene, la 5 (23,28%) – în 2 gene și la 12 (51.14%) – în 3 gene.

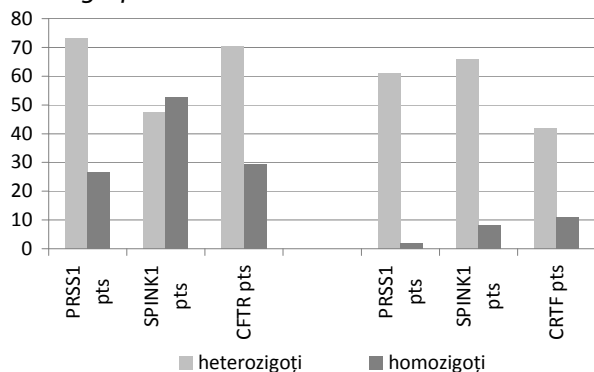
Anamneza familială de PC la rudele de gr. I, II a fost menționată la 13 pacienți, întrebunțarea alcoolului – la 17, tabagismul – la 19, patologia colecistului – la 15 pacienți. Dereglări de alimentație cu abuz de alimente grase, prăjite, hiper- sau hipoproteice, mese neregulate au fost menționate de toți pacienții. La fel, la toți bolnavii cercetați s-a confirmat insuficiența exocrină, la 4 – diabet zaharat (la 2 – insulinneccesitant), iar la 13 pacienți s-au depistat chisturi și pseudochisturi, complicate cu hipertensiune portală – 9 persoane, stază biliară – 6, duodenostază – 11, hemoragie – 2, parapancreatită 1 pacient, angiocolită – 1, perforație a pseudochistului în abdomen – 1 bolnav.

18 pacienți au necesitat intervenții chirurgicale: splaniectomie endoscopică – 2 bolnavi,

pancreatojejunoanastomoză pe ansă izolată a la Roux – 5 pacienți, pancreatojejunoanastomoză+coledocojejunoanastomoză pe ansă bispiculară a la Roux – 2, drenare externă a chistului – 2 bolnavi, chistpancreatojejunoanastomoză pe ansă izolată a la Roux – 7, pancreatojejunoanastomoză – 1 pacient, coledocojejunoanastomoză – 5, gastrojejunoanastomoză – 2, protezarea coledocului – 2; 9 pacienți au suportat câte 2 și mai multe intervenții chirurgicale pe pancreas.

Rezultatele obținute în grupul de control au demonstrat prezența alelelor-mutant ale genei PRSS1 la 63% din cei investigați, dintre care 61% heterozigoți și 2% homozigoți; la 74% s-au depistat mutații ale SPINK1 (66% heterozigoți, 8% homozigoți) și la 53% – mutații ale CFTR (42% heterozigoți, 11% homozigoți). Doar la 6% nu s-a identificat prezența alelelor-mutant ale PRSS1, SPINK1, CFTR. Din grupul celor incluși în studiu, la 24% s-au decelat mutații la nivelul unei singure gene, la 44% – în 2 gene și la 26% – în 3 gene.

Prezența alelelor-mutant ale PRSS1, SPINK1, CFTR la pacienții cu pancreatită cronică pseudotumorală versus grupul de control



Conform datelor din literatură, incidența celei mai frecvent întâlnite mutații N34S a SPINK1 este de aproximativ 1-2,5% în populația generală, dintre care aproximativ 1% este heterozigotă pentru N34S [8] și mai puțin de 1% din purtători dezvoltă pancreatite [19]. Frecvența mutației N34S este considerabil mai mare în rândul pacienților care dezvoltă pancreatite decât printre cei sănătoși, iar rata asociației pancreatitei este mai mare în tipul homozigot al mutației N34S [4], la persoanele sănătoase fiind detectată cu o frecvență de 1/10000.

Analiza secvențierii complete a CFTR și a mutațiilor PRSS1 și SPINK1 în PC a depistat 25% și 30% de purtători a cel puțin o mutație CFTR și câțiva au fost determinați ca fiind heterozigoți pentru diferite mutații CFTR sau transheterozigoți pentru o mutație CFTR și o mutație SPINK1 sau PRSS1 [12]. S-a demonstrat că bolnavii 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 [12]. Îmbinarea de 2 mutații CFTR și mutația N34S a inhibitorului pancreatic de tripsină (SPINK1) crește riscul pentru pancreatite de 900 de ori (Grendell J.H., 2003).

Asocierea mutațiilor CFTR cu pancreatitele alcoolice este incertă, fiind absentă în unele studii [13] și prezentă la 23-40% din pacienții italieni (Pezzilli R. et al., 2003), spanioli (Casals T., 2004) și japonezi (Fujiki K. et al., 2004). În 2004, Casals T. și coautorii au presupus că există un spectru diferit de mutații CFTR la pacienții cu PC alcoolică versus cei cu PC idiopatică. Într-un studiu-pilot efectuat în Japonia s-a determinat prezența disfuncțiilor genei CFTR la 52% din pacienții cu PC vs 16% control [10]. 50% din bolnavii de PC idiopatică instalată timpuriu au mutații SPINK1 sau CFTR. 52-81% din pacienții cu pancreatită ereditară au mutații ale genei PRSS1 [2].

Rezultatele obținute, în contextul datelor din literatură, demonstrează importanța mutațiilor genelor implicate în patogenia pancreatitei cronice, iar asocierea acestor mutații între ele și a altor cofactori crește semnificativ riscul de dezvoltare a pancreatitei cronice și a complicațiilor ei.

Concluzii

1. Studiul a demonstrat o frecvență înaltă a alelelor-mutant ale genelor PRSS1, SPINK1, CFTR la pacienții cu pancreatită cronică pseudotumorală, care în asociere cu alți factori de risc determină evoluția severă a bolii.

2. Rolul variațiilor genice cunoscute în dezvoltarea pancreatitei cronice trebuie să fie apreciat în contextul acțiunii factorilor de mediu, celor metabolici și a altor mutații genice posibile, care pot influența evoluția bolii, iar asocierea acestor factori urmează a fi luată în considerație la identificarea cât mai timpurie a persoanelor susceptibile pentru pancreatita cronică, în reducerea frecvenței, complicațiilor, în elaborarea tratamentului și profilaxiei acestei patologii.

Bibliografie

- Alsamarrai A., Das Stephanie L.M., Windsor J. A., Petrov M. S. *Factors That Affect Risk for Pancreatic Disease in the General Population: a Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies*. In: Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2014, Feb. 5. pii: S1542-3565-(14)00183-9. doi: 10.1016/j.cgh.2014.01.038.
- DiMigno M.J., DiMiagno E.P. *Chronic pancreatitis*. In: Curr. Opin. Gastro, 2005, nr. 21/5, p. 544-554.
- 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.

4. Grigorescu M. *Genetic factors in pancreatitis*. In: Romanian Journal of Gastroenterology, March 2005, nr. 14(1), p. 53-61.
5. Hirota M., Ohmuraya M., Baba H. *Genetic background of pancreatitis*. In: Postgrad. Med. 2 J., 2006, nr. 82, p. 775-778.
6. 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.
7. Jessica La Rusch J., David C., Whitcomb D.C. *Genetics of Pancreatitis with a focus on the Pancreatic Ducts*. In: Minerva Gastroenterol. Dietol., 2012, December, nr. 58(4), p. 299-308.
8. Kazal La, Spicer Ds., Brahinsky Ra. *Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas*. In: J. Am. Chem. Soc., 1948, nr. 70, p. 3034-3040.
9. Lerch M.M. *Genetic risk factors for pancreatitis*. Genetics in gastrointestinal and liver diseases. Cluj-Napoca, 7/9 apr. 2011. In: Journal of Gastrointestinal and liver diseases, 2011, nr. 20 (1), p. 9-10.
10. Naruse S., Ishiguro H., Suzuki Z., et al. *A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis*. In: Pancreas, 2004, nr. 28, p. 80-85.
11. Noone P.G., Zhou Z., Silverman L.M., et al. *Cystic Fibrosis Gene Mutations and Pancreatitis Risk: Relation to Epithelial Ion Transport and Trypsin Inhibitor Gene Mutations*. In: Gastroenterology, 2001, nr. 121, p. 1310-1319.
12. Reddy D.N., Prasad S.S. *Genetic basis of chronic pancreatitis in Asia Pacific region*. In: J. Gastroenterol. Hepatol., March 2011, nr. 26(2), p. 2-5.
13. Sharer N., Schwartz M., Malone G., et al. *Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis*. In: New Engl. J., 1998, nr. 339, p. 645-652.
14. Singh S., Choudhuri G., Sarita Agarwal S. *Frequency of CFTR, SPINK1, and Cathepsin B Gene Mutation in North Indian Population: Connections between Genetics and Clinical Data*. In: Scientific World Journal, 2014, nr. 763195. Published online Jan 27, 2014. doi: 10.1155/2014/763195
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. Witt H., Luck W., Becker M., Böhmig M., Kage A., Truninger K., et al. *Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis*. In: J.A.M.A., 2001, nr. 285, p. 2716-2717.
17. Whitcomb D.C. *Genetic Risk Factors for Pancreatic Disorders*. In: Gastroenterology, 2013, nr. 144(6), p. 1292-1302.
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.

Rodica Bugai, asistent universitar,
 Clinica medicală nr. 7,
 Departamentul Medicină Internă,
 USMF N. Testemițanu,
 str. Sf. Arh. Mihail 38, Chișinău,
 tel.+373 22 292674;
 e-mail: rodica_b2004@yahoo.com