УТИЦАЈ ГЕНЕТСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА НА ТОК И ИСХОД АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

Иван Радосављевић¹, Наташа Ђорђевић²

¹ Катедра за хирургију, Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

² Катедра за фармакологију и токсикологију,
Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISM ON THE COURSE AND OUTCOME OF ACUTE PANCREATITIS

Ivan Radosavljević¹, Nataša Djordjević²

¹ Department of Surgery, Medical Faculty, University of Kragujevac

² Department of Pharmacology and Toxicology,
Medical Faculty, University of Kragujevac

Примљен/Received: 28.7.2011.

Прихваћен/Accepted: 3.10.2011.

СКРАЋЕНИЦЕ

CFTR – регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози (енгл. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

DEFB1 - β дефенсин (енгл. epithelial-derived human β -defensin 1)

GSTT-1 - глутатион-S-трансфераза T-1 (енгл. glutathione-S-transferase-theta-1)

HSP70-2 - протеин топлотног шока 70-2 (енгл. heat shock protein 70-2)

IL-8 - интерлеукин 8 (енгл. interleukin 8)

IL-10 - интерлеукин 10 (енгл. interleukin 10)

MCP-1 - моноцитни хемотаксични протеин 1 (енгл. monocyte chemotactic protein-1)

PRSS1 - катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen)

SPINK1- инхибитор панкреасног трипсина (енгл. pancreatic secretory trypsin inhibitor, i.e. serine protease inhibitor Kazal type 1)

TNF- α - фактор некрозе тумора α (енгл. tumor necrosis factor- α)

TNF- β - фактор некрозе тумора β (енгл. tumor necrosis factor- β)

САЖЕТАК

Акутни панкреатитис представља акутно запаљење панкреаса, које настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и превремене активације протеолитичких проензима. На настанак, тежину и исход овог обољења, између осталог, у одређеној мери могу утицати и варијације појединих гена. У најзначајније полиморфне протеине са потенцијалом утицаја на развој и ток акутног панкреатитиса могу се убројити панкреасни протеини, међу којима се истичу катјонски трипсиноген (PRSS1), инхибитор панкреасног трипсина (SPINK1) и регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози (CFTR), као и поједини медијатори запаљења, укључујући факторе некрозе тумора α (TNF- α) и β (TNF- β), интерлеукине 8 (IL-8) и 10 (IL-10), моноцитни хемотаксични протеин 1 (MCP-1), глутатион-S-трансферазу T-1 (GSTT-1), протеин топлотног шока 70-2 (HSP70-2) и β дефенсин (DEFB1). Досадашња истраживања, која сведоче о значајној улози генетске предиспозиције у настанку и развоју акутног панкреатитиса, указују на то да би

генотипизација као трајна анализа могла да укаже на популацију изложену ризику од настанка овог обољења, послужи као маркер тежине очекиване клиничке слике и пружи смернице за правовремену и оптималну терапију.

Кључне речи: панкреатитис, акутни, генетика, полиморфизам

ABSTRACT

Acute pancreatitis represents an acute inflammation of the pancreas, which occurs as a result of failure of protective physiological mechanisms and premature activation of proteolytic proenzymes. The occurrence, severity and outcome of this disease are, to a certain extent, affected by genetic variations. The most important polymorphic proteins, with a potential of impact on the development and course of acute pancreatitis, include (a) pancreatic proteins: cationic trypsinogen (PRSS1), pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), and (b) mediators of inflammation: tumor necrosis factor α (TNF- α) and β (TNF- β), interleukins 8 (IL-8) and 10 (IL-10), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), glutathione-S-transferase-theta-1 (GSTT-1), heat shock protein 70-2 (HSP70-2) and epithelial-derived human β -defensin (DEFB1). Previous investigations that described the important role of genetics in the occurrence and development of acute pancreatitis, suggest that genotyping as a permanent analysis can indicate the population at risk of developing the disease, serve as a marker of expected disease severity and provide clinical guidelines for timely and optimal treatment.

Кључне речи: pancreatitis, acute, genetics, polymorphism

УВОД

Акутни панкреатитис представља акутно запаљење панкреаса, које настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и превремене активације протеолитичких проензима¹⁻³. Последица аутодигестија панкреаса праћена је акутном инфламацијом, чији степен додатно одређује тежину клиничке слике и исход обољења. Лакши облик панкреатитиса је најчешћи и карактерише се инфламаторним процесом који се задржава на нивоу панкреаса. Нажалост, у око 20% пацијената обољење изазива системски инфламаторни одговор, који оштећује велики број

органа и води у неповољан ток и исход болести^{2,3}.

Различити етиолошки фактори доприносе настанку акутног панкреатитиса и регулишу интензитет и обим инфламаторног одговора, укључујући присуство опструкције, примену појединих лекова, метаболичке поремећаје, инфекције, алкохолизам или трауму^{2,3}. Међутим, и генетска предиспозиција, тј. варијације гена, у одређеној мери могу утицати на настанак, тежину и исход овог обољења^{2,4-9}. Наиме, у акутном панкреатитису значајну улогу игра велики број ензима и цитокина. Неки од њих испољавају генетски полиморфизам, што значи да се гени који их кодирају у популацији могу наћи у више различитих облика, односно алела. Истраживања су показала да присуство или одсуство одређене варијације појединих гена код пацијента који болује од акутног панкреатитиса може представљати фактор ризика за развој теже клиничке слике и неповољан исход. Према досадашњим резултатима, у најзначајније полиморфне протеине са потенцијалом утицаја на развој и ток акутног панкреатитиса могу се убројити (а) панкреасни протеини: катјонски трипсиноген^{1,10-12}, инхибитор панкреасног трипсина^{1,11,13} и регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози^{1,3,12,14}, као и (б) медијатори запаљења: фактори некрозе тумора α и β ^{3,5,9,15}, интерлеукини 8 и 10^{5,7,11}, моноцитни хемотаксични протеин 1^{2,5,16}, глутатион-S-трансфераза T-1^{5,12}, протеин топлотног шока^{5,8} и β дефенсин⁴.

ГЕНЕТСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ ПАНКРЕАСНИХ ПРОТЕИНА

Катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen, PRSS1) је најзаступљенија форма најзначајнијег панкреасног проензима трипсиногена, која се у трипсин активира под дејством ентерокиназе или другог молекула трипсина. Са друге стране, трипсин се инаktivира аутолизом, тј. пресецањем бочног пептидног ланца под дејством другог молекула трипсина. Ген PRSS1 (енгл. serine protease-1), који кодира катјонски трипсиноген, полиморфан је, а у најзначајније варијације спадају супституција гуанина аденином на позицији 365 и аденина тимином на позицији 86. Полиморфизам 365G>A доводи до замене аминокиселина у бочном пептидном ланцу (аргинин се замењује хистидином, R122H), што трипсин чини отпорним на аутолизу и трајно активним. Са друге стране, полимор-

физам 86A>T мења конформациону структуру протеина (аспарагин се замењује изолеуцином у бочном пептидном ланцу, N29I), чиме заклања место везивања инхибитора трипсина. Истраживања су показала значајнију повезаност варијације 365G>A са настанком и тежином акутног панкреатитиса, јер, у односу на носиоце 86A>T полиморфизма, такви пацијенти раније оболевају и имају тежу клиничку слику^{1,10-12}. Ређе варијације PRSS1 гена укључују и оне које кодирају замене аминокиселина A16V, K23R, E79K и слично, али њихова улога у акутном панкреатитису за сада није довољно испитана¹.

Инхибитор панкреасног трипсина (енгл. pancreatic secretory trypsin inhibitor, i.e. serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1) продукт је ацинусних ћелија панкреаса, са улогом да спречи прерану активацију трипсиногена и последицну панкреасну аутодигестију. Он представља прву линију одбране од настанка панкреатитиса, јер може инхибирати до 20% трипсинске активности у панкреасу. Ова протективна функција је само привремена, јер и комплекс трипсин - SPINK1 може бити супстрат за трипсин, што за резултат има деградацију SPINK1 и дезинхибицију функције трипсина. Варијације гена који кодира SPINK1 најчешће доводе до смањења функције инхибитора панкреасног трипсина, па се сматра да њихово присуство може утицати на тежину клиничке слике акутног панкреатитиса^{10,11}. Међу најзначајнијим SPINK1 варијацијама истиче се полиморфизам појединачног нуклеотида 101A>G, који доводи до замене аспарагина серином на позицији 34 (N34S). Сматра се да присуство 101A>G полиморфизма повећава ризик од настанка панкреатитиса, нарочито у комбинацији са другим генетским и/или негенетским факторима ризика^{1,11,13}. Остале ређе варијације SPINK1 гена, о чијој улози у акутном панкреатитису се за сада мало зна, укључују -215G>A, -215G>T, 2T>C и друге¹.

Регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози (енгл. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) налази се на епителним ћелијама панкреасних канала и има заштитну улогу, јер омогућава секрецију бикарбоната и тиме побољшава проток панкреасног сока. Ген који кодира CFTR изузетно је полиморфан и до данас је познато преко 1600 различитих варијанти, које се на основу ефекта на функцију протеина могу сврстати у шест различитих категорија. Прве три категорије доводе до

смањене синтезе протеина, измењене обраде протеина или дефектне активације, што је праћено потпуним губитком функције CFTR. Остале три групе доводе до смањења функције или количине протеина, односно до његове нестабилности. У најзаступљеније, а тиме и клинички најзначајније варијације CFTR гена убрајају се полиморфизми појединачних нуклеотида 1408G>A (M470V) и 350G>A (R117H), делеција кодона 1522_1524 delTTT (ΔF508) и интронска варијација 5T, за које се сматра да могу утицати на количину функционалног протеина CFTR, као и на ток панкреатитиса. Од осталих мање фреквентних варијација у литератури се најчешће срећу оне које изазивају измене аминокиселина по типу R553X, N1303K или G551D^{1,3,12,14}.

ГЕНЕТСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ МЕДИЈАТОРА ЗАПАЉЕЊА

Фактор некрозе тумора α (енгл. tumor necrosis factor-α, TNF-α) сматра се основним медијатором запаљења и првим цитокином који се ослобађа као реакција на ендотоксине. Иако има кратак полуживот, па је његова вредност као маркера за исход акутног панкреатитиса вероватно ограничена, његов значај се огледа у томе што он покреће каскаду стварања других проинфламаторних цитокина који доприносе развоју запаљења. У току тешког акутног панкреатитиса TNF-α се продукује у многим органима и његов ниво корелира са тежином клиничке слике, па је системско ослобађање често праћено септичним шоком и смртним исходом. Ген који га кодира полиморфан је, а највише испитиване варијације су на нивоу промотора, и то -308G>A и -238A>G⁹. Иако има и супротних закључака^{17,18}, многа досадашња истраживања указала су на повезаност поменутих полиморфизама са тежином клиничке слике панкреатитиса^{3,5,9,15}. Наиме, значајна разлика у дистрибуцији полиморфизма -308G>A код пацијената са тешком клиничком сликом акутног панкреатитиса и септичним шоком у поређењу са лакшим пацијентима указује на повезаност ове варијације са тежином обољења⁸. Полиморфизам -238A>G такође је доведен у везу са неповољним исходом болести, јер се сматра да доприноси оштећењу плућа и развоју шока^{3,15}, нарочито у присуству варијација гена за PRSS1, чије ефекте може модулирати^{1,3}.

Фактор некрозе тумора β (енгл. tumor necrosis factor-β, TNF-β) везује се за исте рецеп-

торе и испољава сличне ефекте као TNF- α , а за сада једина проучена варијација кодирајућег гена под називом NcoI полиморфизам (изазива замену аспарагина треонином на позицији 26) заступљенија је код пацијената оболелих од акутног панкреатитиса праћеног септичним шоком⁹.

Интерлеукин 8 (енгл. interleukin 8, IL-8) је проинфламаторни цитокин кога стварају макрофаги и епителне ћелије, а чија је главна улога активирање неутрофила током запаљења. У акутном панкреатитису IL-8 учествује у настанку системског инфламаторног одговора, чиме доприноси развоју компликоване клиничке слике акутног панкреатитиса. Истраживања су показала да концентрација IL-8 током акутног панкреатитиса расте нарочито уколико је пацијент носилац варијације -251T>A кодирајућег гена. Због тога се присуство овог полиморфизма сматра генетском предиспозицијом за развој теже клиничке слике^{5,6}.

Интерлеукин 10 (енгл. interleukin 10, IL-10) је анти-инфламаторни цитокин који супримира ћелијски одговор на запаљење, чиме утиче и на ток акутног панкреатитиса. Поједине студије указале су на повезаност варијација гена који кодира IL-10 са ризиком од отказивања органа током акутног панкреатитиса¹¹, док друге улогу IL-10 у развоју овог обољења нису утврдиле¹. Иако ген који кодира IL-10 није изражено полиморфан, до данас је откривено неколико његових варијација. Међу њима се посебно истиче полиморфизам појединачног нуклеотида -1082G>A, који доводи до смањења продукције функционалног протеина, а учесталији је код пацијената оболелих од тешког акутног панкреатитиса праћеног септичним шоком^{5,7}. Због анти-инфламаторне улоге у развоју акутног панкреатитиса, постоје наговештаји да би генетски полиморфизам IL-10, у поређењу са проинфламаторним медијаторима, могао имати чак значајнију улогу у патогенези септичног шока у касној фази тешке форме овог обољења⁷.

Моноцитни хемотаксични протеин 1 (енгл. monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) је цитокин кога излучују мононуклеарне ћелије у току акутног запаљења и чија је улога да привуче лимфоците, моноците, мастоците и еозинофиле на место инфламације. Сматра се важним медијатором запаљења у раној фази акутног панкреатитиса, а његова концентрација сразмерна је тежини клиничке слике^{2,5}. Поједина истраживања^{2,5}, али не

сва¹⁶, показала су да присуство варијације -2518A>G гена који кодира MCP-1 повећава количину синтетисаног протеина, што значајно погоршава клиничку слику код акутног панкреатитиса и повећава ризик од смртог исхода. Пошто са тежином клиничке слике и исходом болести корелирају како ниво MCP-1 у серуму, тако и присуство варијације -2518A>G, сматра се да би се оба могла употребити и као маркери развоја тешког облика акутног панкреатитиса са високим ризиком за смртни исход².

Глутатион-S-трансфераза T-1 (енгл. glutathione-S-transferase-theta-1, GSTT-1) је антиоксидантни ензим који штити панкреас од оксидативног стреса. Сматра се да функционални ензим (GSTT-1*A) смањује ризик од настанка акутног панкреатитиса, али и да повећава оштећење органа током већ насталог запаљења и погоршава клиничку слику, с обзиром да се чешће јавља код тешких форми обољења. Међу најбоље изученим варијацијама налази се делеција гена (GSTT-1 null), која је учесталија код лакших форми, па се за њу претпоставља да делује протективно на терену већ насталог акутног панкреатитиса^{5,12}.

Протеин топлотног шока 70-2 (енгл. heat shock protein 70-2, HSP70-2) настаје током оксидативног стреса и запаљења у ацинусним ћелијама панкреаса и штити ћелије од оштећења и апоптозе. Најзначајнија варијација гена који кодира HSP70-2 је полиморфизам појединачног нуклеотида у кодирајућем региону 1267A>G. Присуство ове варијације узрокује смањену експресију HSP70-2, а пошто је заступљенија је код пацијената оболелих од теже форме акутног панкреатитиса у односу на лакше пацијенте или здраве добровољце, то указује на потенцијалну примену генотипизације 1267A>G у прогностичке сврхе^{5,8}.

β дефенсин (енгл. epithelial-derived human β -defensin 1, HBD-1, кодирајући ген DEFB1) је антимикробни пептид који штити епителне ћелије црева и панкреаса од бактерија, вируса и гљивица. Најчешће варијације DEFB1 кодирајућег гена налазе се у 5'-региону и укључују -20G>A, -44C>G и -52G>A. Истраживања су показала да су наведени полиморфизми значајно фреквентнији код пацијената оболелих од тешког облика акутног панкреатитиса у поређењу са здравим добровољцима, као и да је ризик од развоја инфициране некрозе панкреаса као компликације акутног

запаљења већи код носиоца –20А и –52А алела DEFBI гена⁴.

ЗАКЉУЧАК

Код пацијента већ оболелог од акутног панкреатитиса, ток обољења може се у одређеној мери предвидети на основу клиничких параметара или биохемијских анализа. Међутим, у циљу ране дијагностике и оптимизације исхода лечења, могућност да се унапред укаже на ризик од развоја обољења и/или тешке клиничке слике била би од изузетног значаја. Досадашња истраживања сведоче о томе да генетска предиспозиција игра важну улогу у настанку и развоју акутног панкреатитиса, те да би генотипизација као трајна анализа могла да укаже на популацију изложену ризику, послужи као маркер тежине очекиване клиничке слике и пружи смернице за правовремену и оптималну терапију. При том не треба заборавити да је акутни панкреатитис комплексно обољење, због чега генетски полиморфизам као фактор ризика и потенцијални маркер не треба посматрати одвојено, већ увек у склопу са осталим чиниоцима који могу модулирати ток и исход овог обољења.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grigorescu M, Grigorescu MD. Genetic factors in pancreatitis. *Rom J Gastroenterol* 2005; 14: 53-61.
2. Papachristou GI, Sass DA, Avula H et al. Is the monocyte chemotactic protein-1 -2518 G allele a risk factor for severe acute pancreatitis? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 475-81.
3. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. *Annu Rev Med* 2010; 61: 413-24.
4. Tiszlavicz Z, Szabolcs A, Takacs T et al. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2010; 10: 483-90.
5. Papachristou GI, Clermont G, Sharma A et al. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 277-96.
6. Hofner P, Balog A, Gyulai Z et al. Polymorphism in the IL-8 gene, but not in the TLR4 gene, increases the severity of acute pancreatitis. *Pancreatol* 2006; 6: 542-8.
7. Zhang DL, Zheng HM, Yu BJ et al. Association of polymorphisms of IL and CD14 genes with acute severe pancreatitis and septic shock. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4409-13.
8. Balog A, Gyulai Z, Boros LG et al. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: e46-50.
9. Zhang D, Li J, Jiang ZW et al. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 112: 138-43.
10. Rolston RK, Kant JA. Genetic testing in acute and chronic pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3: 115-20.
11. Grendell JH. Genetic factors in pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 105-9.
12. Khan AS, Latif SU, Eloubeidi MA. Controversies in the etiologies of acute pancreatitis. *Jop* 2010; 11: 545-52.
13. Gomez-Lira M, Bonamini D, Castellani C et al. Mutations in the SPINK1 gene in idiopathic pancreatitis Italian patients. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 543-6.
14. Zoller H, Egg M, Graziadei I et al. CFTR gene mutations in pancreatitis: Frequency and clinical manifestations in an Austrian patient cohort. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119: 527-33.
15. de-Madaria E, Martinez J, Sempere L et al. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas* 2008; 37: 295-301.
16. Masamune A, Ariga H, Kume K et al. Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 974-8.
17. Tukiainen E, Kylanpaa ML, Puolakkainen P et al. Polymorphisms of the TNF, CD14, and HSPA1B genes in patients with acute alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2008; 37: 56-61.
18. Ozhan G, Yanar HT, Ertekin C, Alpertunga B. Polymorphisms in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) gene in patients with acute pancreatitis. *Mediators Inflamm* 2010; doi:10.1155/2010/482950.