

МУТАЦИИ ХИМОТРИПСИНОГЕНА С В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

Ю. Кучерявый¹, кандидат медицинских наук,
А. Смирнов², З. Тибилова¹

¹МГМСУ, ²Поликлиника № 2 Минэкономразвития России, Москва
E-mail: propped@mail.ru

Идентификация мутаций химотрипсиногена С расширила представления о патофизиологии хронического панкреатита (ХП). В обзоре рассмотрены механизмы развития ХП при наличии мутаций этого гена. Скорее всего, в большинстве случаев ХП модификаторами болезни выступают мутации тех или иных генов, возможно, вместе с другими, не идентифицированными пока генетическими, экзогенными и экологическими кофакторами.

Ключевые слова: хронический панкреатит, мутации, химотрипсиноген С.

Хронический панкреатит (ХП) — это группа заболеваний поджелудочной железы (ПЖ) различной этиологии, характеризующаяся вариабельной воспалительной инфильтрацией мезенхимальными клетками паренхимы и протоков органа; итогом длительного персистирования такого воспаления становится развитие необратимых изменений экстрацеллюлярного матрикса и фиброза [1]. В клиническом аспекте ХП является болезнью, в большинстве случаев характеризующейся рецидивирующими эпизодами малоспецифичного болевого абдоминального синдрома и, как правило, прогрессирующей экзокринной и эндокринной недостаточностью ПЖ.

В странах Западной Европы алкоголь на протяжении многих лет считали наиболее важным фактором риска развития ХП. Отчасти поэтому в течение многих десятилетий ХП расценивали как достаточно однородное и, как правило, неизлечимое заболевание, наиболее часто встречающееся в районах с низким уровнем дохода на душу населения, который определенно влияет на качество продуктов питания и частоту злоупотребления алкоголем и табакокурением. Крупные клинические исследования последних десятилетий доказали, что подобное представление ошибочно. Фиброз ПЖ с развитием функциональной панкреатической недостаточности при ХП, исходя из современных представлений, возникает вследствие экзогенных (экологических, инфекционных, нутритивных, токсических) и эндогенных (генетических, воспалительных) изменений, совокупность которых и приводит (с вариабельным вкладом разных составляющих) к развитию заболевания у конкретного индивидуума [2]. Подобный подход в понимании танатогенеза ХП отражен в современных классификационных системах этого заболевания [3].

Именно наличием генетических изменений и объясняется развитие многих случаев панкреатита, его тяжести и осложнений. Генетическая теория развития и прогрессирования ХП позволяет объяснить, почему у одних лиц, длительно злоупотребляющих алкоголем, развивается ХП, а у других — нет. Различные генные мутации и поли-

морфизмы, вероятно, определяют восприимчивость человека к развитию ХП, как правило, за счет ослабления протективных механизмов ПЖ. Ежегодное увеличение числа вновь открытых мутаций свидетельствует о том, что пока известна лишь часть возможных генетических изменений, приводящих к развитию ХП. Поэтому принято считать, что если наследственный панкреатит (НП) можно предположить исходя из особенностей клинического течения и семейного анамнеза, а генетический скрининг не выявляет конкретной мутации, это не исключает диагноз НП [4].

Менее десятилетия назад мы определяли НП как редкую патологию ПЖ, клинически характеризующуюся повторными эпизодами острого панкреатита в виде болевого абдоминального и диспепсического синдромов, постепенно увеличивающейся частотой и выраженностью рецидивов, нарастанием степени функциональной (экзокринной и/или эндокринной) панкреатической недостаточности, отягощенным семейным анамнезом, высоким риском рака ПЖ [5]. Сегодня можно считать, что широкий спектр возможных ассоциаций генотипа/фенотипа НП включает и прямые аутосомные доминирующие черты заболевания с почти полной пенетрантностью (доминантные мутации гена PRSS1), и «мягкие» генетические факторы риска без признаков менделевского наследования (мутации генов панкреатического секреторного ингибитора трипсина — SPINK1) и трансмембранного регулятора кистозного фиброза (CFTR), химотрипсиногена (CTRC) и др.

Таким образом, идентификация мутаций различных генов привела к изменению представлений о патофизиологии ХП, в некоторой степени определив значимость влияния факторов окружающей среды на степень пенетрации НП, на выраженность клинической симптоматики и возраст начала заболевания. Недавно открыты генетические изменения у больных ХП в виде мутации гена CTRC, чему и посвящен данный обзор.

Ген CTRC кодирует один из пищеварительных (протеолитических) ферментов ПЖ (химотрипсин С или кальдекрин), физиологическая роль которого заключается в интрапанкреатической деградации трипсина и трипсиногена [6–8]. Доказано, что химотрипсин С разрушает человеческий трипсин и все изоформы трипсиногена с высокой специфичностью [7]. Поэтому, поскольку при мутациях гена CTRC отмечаются уменьшение или полное отсутствие секреции химотрипсина С и (или) потеря его каталитической активности, предположено, что риск развития ХП у носителей мутаций гена CTRC, возможно, возрастает за счет неспособности химотрипсина С блокировать чрезмерную интрапанкреатическую активацию трипсина [6, 9].

Первые клинические исследования, посвященные изучению потенциального влияния мутаций гена CTRC, были проведены в Германии [6] и Франции [8].

Крупнейшая работа, выполненная в Германии, включала более 900 больных идиопатическим или семейным ХП и почти 3000 обследованных лиц. Большинство мутаций гена CTRC было локализовано в экзонах 2, 3, и 7. В целом авторами были идентифицированы 11 миссенс-мутаций и 2 делеции в гене CTRC (табл. 1). Две самые частые разновидности — с.760 C>T (p.R254 W) и с.738_761 del24 (p.K247_R254 del) — соответственно 2,1 и 1,2%; обе расположены в экзоне 7. В совокупности эти 2 мутации статистически достоверно чаще встречались у больных ХП (у 30 из 901; 3,3%), чем у здоровых (у 21 из 2804; 0,7%) (отношение шансов (ОШ) — 4,6; доверительный интервал — ДИ — 2,6–8,0; p=1,3•10⁻⁷). Вариант

c.738_761 del24, вызывающий делецию 8 аминокислот – от Lys247 до Arg254 (p.K247_R254 del), показал самую сильную ассоциацию с развитием ХП (ОР – 11,5; ДИ – 3,2–41,5; p=0,00003). При анализе в этиологических подгруппах продемонстрирована сопоставимая частота этих 2 гетерозиготных мутаций при наследственном (у 6 из 143, что составило 4,2%; все больные – с мутацией p.R254 W) и идиопатическом ХП (у 24 из 758, что составило 3,2%; 13 больных – с мутацией

p.R254 W и 11 – с мутацией p.K247_R254 del). Один пациент с идиопатическим ХП имел 2 гетерозиготные мутации, одна из которых (p.V235 I) была унаследована от матери, а другая (p.R254 W) – от отца [6].

Для подтверждения полученных результатов дополнительно были обследованы 348 больных алкогольным ХП (независимый контингент) и 432 пациента с алкогольной болезнью печени без ХП в качестве контроля. Было обна-

Таблица 1

Мутации гена СТРС, выявленные у больных идиопатическим и наследственным ХП и в контроле (здоровые) (по [6])

Экзон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Идиопатический ХП, n (%)	НП, n (%)	Все больные ХП, n (%)	Контроль, n (%)	p	ОШ	95% ДИ
2	c.103G>C	p.D35H	0/758 (0)	0/143 (0)	0/901 (0)	1/2689 (0,04)	1,0	–	–
	c.103G>A	p.D35N	0/758 (0)	0/143 (0)	0/901 (0)	1/2689 (0,04)	1,0	–	–
	c.110G>A	p.R37Q	5/758 (0,7)	1/143 (0,7)	6/901 (0,7)	10/2689 (0,4)	0,25	–	–
3	c.143A>G	p.Q48R	0/758 (0)	2/143 (1,4)	2/901 (0,2)	1/2689 (0,04)	0,16	–	–
4	c.308delG	p.G103VfsX31	0/499 (0)	1/122 (0,8)	1/621 (0,2)	0/614 (0)	1,0	–	–
6	c.514A>G	p.K172E	0/499 (0)	0/122 (0)	0/621 (0)	1/614 (0,2)	0,5	–	–
7	c.649G>A	p.G217S	2/758 (0,3)	0/143 (0)	2/901 (0,2)	1/2804 (0,04)	0,15	–	–
	c.652G>A	p.G218S	0/758 (0)	0/143 (0)	0/901 (0)	1/2804 (0,04)	1,0	–	–
	c.659T>G	p.L220R	0/758 (0)	0/143 (0)	0/901 (0)	1/2804 (0,04)	1,0	–	–
	c.674A>C	p.E225A	0/758 (0)	0/143 (0)	0/901 (0)	1/2804 (0,04)	1,0	–	–
	c.703G>A	p.V235I	1/758 (0,1)	0/143 (0)	1/901 (0,1)	1/2804 (0,04)	0,43	–	–
	c.760C>T	p.R254W	13/758 (1,7)	6/143 (4,2)	19/901 (2,1)	18/2804 (0,6)	0,0004*	3,3	1,7–6,4
	c.738_761del24	p.K247_R254del	11/758 (1,5)	0/143 (0)	11/901 (1,2)	3/2804 (0,1)	0,00003*	11,5	3,2–41,5

* Все больные ХП по сравнению с контролем.

Таблица 2

Мутации гена СТРС, выявленные у больных алкогольным ХП и при алкогольной болезни печени без ХП (контроль) (по [6])

Экзон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Алкогольный ХП, n (%)	Контроль, n (%)	p	ОШ	95% ДИ
2	c.110G>A	p.R37Q	0/348 (0)	3/432 (0,7)	0,26	–	–
7	c.649G>C	p.G217R	1/348 (0,3)	0/432 (0)	0,45	–	–
	c.703G>A	p.V235I	1/348 (0,3)	1/432 (0,2)	1,0	–	–
	c.746C>T	p.P249L	1/348 (0,3)	0/432 (0)	0,45	–	–
	c.760C>T	p.R254W	8/348 (2,3)	2/432 (0,5)	0,03	5,1	1,1–24,0
	c.738_761del24	p.K247_R254del	2/348 (0,6)	1/432 (0,2)	0,58	–	–

Таблица 3

Мутации гена СТРС, выявленные у индийцев, страдающих тропическим ХП, в сравнении с индийцами без ХП (по [6])

Экзон	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тропический ХП, n (%)	Контроль, n (%)	p	ОШ	95% ДИ
3	c.190_193delATTG	p.I64Lfs×69	2/71 (2,8)	0/84 (0)	0,21	–	–
	c.217G>A	p.A73T	4/71 (5,6)	0/84 (0)	0,04	11,3	0,6–213
7	c.703G>A	p.V235I	1/71 (1,4)	0/84 (0)	0,46	–	–
	c.760C>T	p.R254W	2/71 (2,8)	1/84 (1,2)	0,60	–	–
	c.778G>A	p.D260N	1/71 (1,4)	0/84 (0)	0,46	–	–
Всего			10/71 (14,1)	1/84 (1,2)	0,0028	13,6	1,7–109

ружено, что и у больных алкогольным ХП мутации гена *CTRC* p.R254 W и p.K247_R254 del встречаются достоверно чаще (у 10 из 348; 2,9%), чем в контроле (у 3 из 432; 0,7%); (ОШ – 4,2; ДИ – 1,2–15,5; $p=0,02$) (табл. 2), что еще раз подтвердило возрастание рисков развития ХП у лиц с наличием мутаций этого гена [6].

Во второй из наиболее крупных работ, проведенных среди жителей Франции (европеоиды) и включавшей 287 пациентов с ХП (идиопатический ХП – у 216 больных, семейный – у 42 и наследственный – у 29), было выявлено 20 обычных мутаций, включая 1 нонсенс-мутацию p.W55 X, микроделецию p.K247_R254 del и 9 миссенс-мутаций. За исключением 2 общих полиморфизмов все остальные 18 мутаций крайне редко (0–0,3%) встречались в контрольной группе. Все редкие мутации обнаруживали значительно чаще у больных идиопатическим ХП, чем в контрольных группах. Так, общая частота регистрации мутаций гена *CTRC* у больных идиопатическим ХП достигла 12% (у 26 из 216), что было существенно выше, чем в контроле (у 4 из 350; 1,1%; ОШ – 11,8; ДИ – 3,9–40,6; $p<10^{-6}$) [8], а также почти в 4 раза выше, чем в немецком исследовании [6].

У больных ХП с гиперпаратиреозом, характеризующихся, как известно, независимым риском развития поражения ПЖ и кальцификации, частота встречаемости точечной мутации p.R254 W гена *CTRC* в недавнем исследовании достигла 6,5%, что достоверно чаще, чем у больных гиперпаратиреозом без панкреатита ($p=0,055$) [10]. Полученные клинические данные также свидетельствуют о повышенном риске развития ХП у лиц с наличием миссенс-мутации p.R254 W гена *CTRC*.

Значительный разброс данных в европейских исследованиях способствовал инициации исследований в других этнических группах и расах. Так, среди мигрантов из Индии, проживающих в Европе, были обследованы 71 пациент с тропическим ХП и 84 – в контроле (обследованные – индусы). Любопытно, что частота мутаций гена *CTRC* среди больных тропическим ХП достигла 14,1% по сравнению с 1,2% в контроле (ОШ – 13,6; ДИ – 1,7–109,2; $p=0,0028$) (табл. 3). Две относительно частых разновидности, найденные у индусы, отсутствовали у немцев – миссенс-мутация с.217 G> (p.A73 T), мутация со сдвигом рамки считывания (знаковая мутация) с.190_193 delATTG (p.I64 Lfs×69). С другой стороны, другая знаковая мутация p.K247_R254 del, которая относительно часто встречалась у немцев с ХП, ни разу не найдена у индусы. Безусловно, нужно учитывать относительную малочисленность включенных в исследование индийцев, однако полученные данные четко подтверждают, что мутации гена *CTRC* повышают риск развития и тропического ХП тоже [6]. Большинство идентифицированных ранее мутаций гена *CTRC* не изменяли рамку считывания транслируемого химо трипсина С. И только 2 этих исключения – с.190_193 delATTG (p.I64 Lfs×69) у индусы и с.308 delG (p.G103 Vfs×31) у немцев – которые вызывают изменение в рамке считывания, могут закончиться укорочением цепи полипептида либо отсутствием синтеза белка на мРНК вообще [6].

В другом крупном недавнем исследовании (150 индийцев с тропическим ХП и 150 человек – контроль) у больных тропическим панкреатитом идентифицирована другая мутация гена *CTRC* – p.G61 R, отсутствующая в контроле. Частота ее встречаемости среди больных тропическим ХП

оказалось весьма невелика (0,7%), но функциональный анализ показал, что данная мутация приводит к полной потере секреции *CTRC* [11].

Наиболее полно мутации гена *CTRC* изучены в Китае и на Тайване М. Chang и соавт. [12]. У 126 больных ХП и 90 здоровых (все – монголоидной расы) исследована последовательность регионов кодирования экзонов 2, 3 и 7 и их соседних интронных областей (интроны 1, 2 и 6) в гене *CTRC*. Частота встречаемости мутаций в гене *CTRC* составила 2,3% (у 3 из 126). Авторами были идентифицированы 4 новые мутации в экзонах 2, 3 и 7, а также 6 новых интронных вариантов в интроне 6, о которых не сообщалось прежде. GAGGGG, GAGGAG и GAGTAG гаплотипы, собранные в 6 локусах интронных изменений с.640–41/с.640–40/с.640–39/с.640–37/с.640–36/с.640–35 (интрон 6), были ассоциированы со значительно более высоким риском развития ХП (ОШ 66,75; 37,00 и 9,37 соответственно).

Ситуации, когда мутация гена *CTRC* приводит к дисфункции синтезированного белка, вполне ясны. Загадкой остаются причины отсутствия его секреции панкреоцитами. Одна из недавно выдвинутых гипотез пытается объяснить механизм отсутствия секреции химо трипсина С при ряде мутаций этого гена. Суть гипотезы заключается в увеличении риска развития ХП путем реализации альтернативного механизма за счет нарушения внутриклеточной посттрансляционной модификации белка вследствие мутации гена *CTRC* [9]. Внутриклеточная задержка немодифицированных белков в эндоплазматическом ретикулуме активирует сигнальный путь для ускорения посттрансляционной модификации (сворачивания) белка и параллельного уменьшения трансляции [13]. Потенциально опасные последствия реализации такого сигнального процесса – активация воспалительного транскрипционного фактора NFκβ и индукция апоптоза и гибели клеток. Данная идея не является новой – впервые она прозвучала годом раньше, когда на модели НП, ассоциированного с мутацией катионического трипсиногена p.R116 C, было показано влияние мутации на посттрансляционное сворачивание белка с задержкой в эндоплазматическом ретикулуме [14].

Итак, в качестве попытки доказать состоятельность указанной гипотезы недавно проведена экспериментальная работа, в которой было доказано действие мутации p.A73 T гена *CTRC* на появление маркеров стресс-нагрузки, повреждения эндоплазматического ретикулума и развитие апоптоза [9]. Внутриклеточный стресс как следствие накопления неспособного вследствие мутации p.A73 T к посттрансляционной модификации химо трипсина С с индукцией стрессиндуцированного апоптоза может способствовать быстрой потере функциональных ацинузов ПЖ, а следовательно, и развитию экзокринной недостаточности – одному из маркеров ХП. Апоптоз панкреатических ацинарных клеток, как было доказано ранее, является своеобразным механизмом защиты от некроза и тяжелой острой воспалительной реакции в моделях экспериментального острого панкреатита [15]. Однако если апоптоз принимает хронический характер, подобный механизм будет неминуемо приводить к потере функционирующей паренхимы ПЖ. Эта мысль поддерживается результатами исследования, демонстрирующего, что в панкреатической ткани больных ХП число апоптотических ацинарных клеток было 10-кратно выше, чем в ПЖ в норме [16].