

## ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИИ N34S В ГЕНЕ *SPINK1* В МОДИФИКАЦИИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

Ю. Кучерявый<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,

З. Тибилова<sup>1</sup>, Д. Андреев<sup>1</sup>, А. Смирнов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва

<sup>2</sup>Поликлиника №2 Минэкономразвития России, Москва

E-mail: dna-mit8@mail.ru

Исследование показало, что наиболее часто мутация N34S в гене *SPINK1* (панкреатический секреторный ингибитор трипсина) отмечалась у больных токсическим и идиопатическим хроническим панкреатитом (ХП). Достоверно высокая частота идентификации указанной мутации у больных с осложненными формами идиопатического ХП предполагает повышение риска развития осложнений заболевания.

**Ключевые слова:** хронический панкреатит, мутации, панкреатический секреторный ингибитор трипсина, *SPINK1*, N34S.

Хронический панкреатит (ХП) — неинфекционное воспалительное заболевание поджелудочной железы (ПЖ), часто ассоциированное с болевым синдромом. ХП характеризуется развитием необратимых морфологических изменений в паренхиме и протоковой системе ПЖ с прогрессирующим замещением функционирующих структур органа соединительной тканью, что приводит к нарушению внешнесекреторной и эндокринной функций [1]. За последние 40 лет в мире отмечена тенденция к росту заболеваемости ХП более чем в 2 раза, что обуславливает широкий практический и научный интерес к данной патологии [2, 3].

Основываясь на современных представлениях, ХП можно охарактеризовать как полиэтиологическое и полипатогенетическое заболевание. К этиологическим факторам, вызывающим ХП, относятся в первую очередь злоупотребление алкоголем, курение, патология билиарного тракта, а также ряд наследственных факторов [1, 2].

Наследственный панкреатит (НП) в течение многих десятилетий оставался редчайшей патологией ПЖ, и только с применением в середине 90-х годов прошлого века генетических исследований был выявлен тип мутаций и классифицирован НП [4, 5]. Сегодня НП считается достаточно распространенной и негомозиготной нозологической формой, поскольку, помимо предполагавшейся ранее и выявленной первой доминантной мутации (ген катионического трипсиногена — *PRSS1*), было обнаружено много рецессивных мутаций, полиморфизмов в различных генах, предрасполагающих к развитию ХП [6, 7]. Согласно современным представлениям, данные генетические изменения могут определять развитие ХП, особенности его течения или быть фактором риска [4].

К наиболее изучаемым генетическим альтерациям, ассоциируемым с НП, можно отнести мутации в гене *SPINK1* (Serine protease inhibitor, Kazal type 1 — по номенклатуре UniGene), кодирующем панкреатический секреторный ингибитор трипсина (ПИТ) [8]. ПИТ синтезируется в ацинарных

клетках ПЖ, содержится в зимогенных гранулах и действует как мощный естественный ингибитор трипсина (образует с трипсином прочную ковалентную связь, инактивируя его), предотвращая аутолиз ПЖ и, следовательно, развитие панкреатита (рис. 1) [9, 10]. С учетом значимой биологической роли ПИТ в контроле над активными формами протеаз в ПЖ, логично предположить, что дисфункция этого белка, вызванная мутациями гена *SPINK1*, может быть причиной развития (или фактором, повышающим риск развития) атаки острого панкреатита и, как следствие, — трансформации в ХП [8, 9, 11].

Мутации в гене *SPINK1* (ПИТ) обнаруживаются с относительно высокой частотой у больных НП — 20,0–23,0%, что в 2,7–7,4 раза превышает частоту носительства мутаций в данных генах у здорового населения [2, 5, 12]. При этом с наибольшей частотой идентифицируется миссенс-мутация N34S в 3-м экзоне гена *SPINK1* [8].

Целью настоящей работы явилось определение значения мутации N34S в гене *SPINK1* в развитии и прогрессировании ХП у населения Москвы и Московской области.

Одномоментное экспериментальное исследование с контролем проведено в 2009–2011 гг. на базе отделения гастроэнтерологии (зав. отделением — Главный гастроэнтеролог ОАО «РЖД» Н.С. Куликовская) Центральной клинической больницы №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД».

В исследовании участвовали 240 больных ХП (основная группа), проживающих в Москве и Московской области, в том числе 118 (49,2%) мужчин и 122 (51,8%) женщины; средний возраст — 45,4±1,7 года. В контрольную группу было включено 107 здоровых обследованных, соответствующих критериям отбора: 48 (44,9%) мужчин и 59 (55,1%) женщин; средний возраст составил 41,3±2,2 года. Для проведения внутривидового анализа, в том числе в сравнении с контролем, среди больных ХП были выделены подгруппы:

- по этиологическому признаку — токсический (алкогольный ХП, панкреатит курильщиков или комбинация — алкоголь+курение), идиопатический, билиарно-зависимый и ХП смешанной этиологии;
- по наличию или отсутствию генетических изменений.

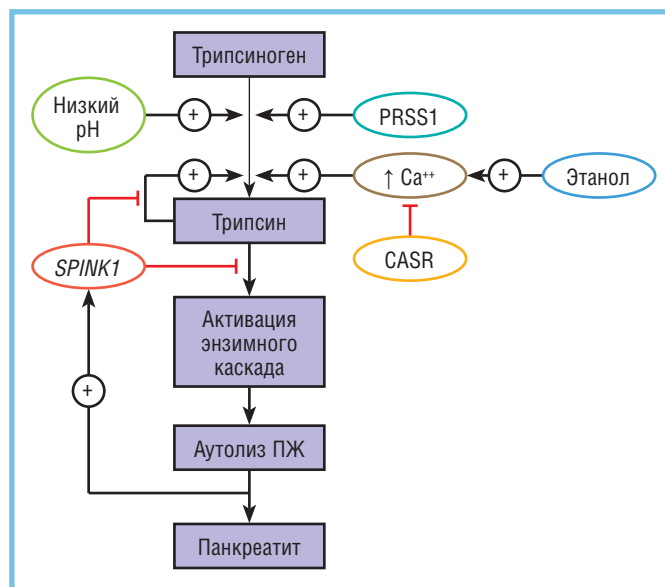


Рис. 1. Роль *SPINK1* в регуляции активации трипсина в ПЖ [9, 10]. PRSS1 — катионический трипсиноген, CASR — кальцийчувствительный рецептор

**Критерии включения в исследование:**

- возраст от 18 до 80 лет;
- европеоидная раса;
- признаки ХП («определенный» или «вероятный» ХП по классификации M-ANNHEIM (Multiple (Многофакторная), Alcohol (Алкоголь), Nicotine (Курение), Nutrition (Нутритивные факторы), Heredity (Наследственность), Efferent pancreatic duct factors (Факторы, влияющие на отток секрета ПЖ (Обструкция)), Immunological factors (Иммунологические факторы), Miscellaneous and Metabolic factors (Различные другие и метаболические факторы). Критерии предложены группой ученых Медицинского факультета Маннгейма университета Хейдельберга [13];
- возможность взятия венозной крови для генетического тестирования;
- подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование включали пациентов, соответствующих всем 5 критериям.

**Критерии исключения из исследования:**

- клиничко-инструментальные признаки острого панкреатита;
- наличие гепатита, цирроза печени любой этиологии;
- холедохолитиаз;
- обострение язвенной болезни желудка и (или) двенадцатиперстной кишки;
- синдром Золлингера–Эллисона;
- состояние после резекции желудка или гастрэктомии, резекции тонкой кишки, правосторонней гемиколэктомии, тотальной колэктомии;
- синдром мезентериальной ишемии;
- любые другие причины хронической диареи (глутеновая энтеропатия, лактазная недостаточность, воспалительные заболевания кишечника и др.);
- сопутствующий прием препаратов, влияющих на тонус большого дуоденального сосочка: антагонистов кальциевых каналов, нитратов;
- любые сопутствующие заболевания в стадии декомпенсации (сердечно-сосудистая, печеночная или почечная недостаточность, сахарный диабет и др.), требующие интенсивных мер и специального лечения;
- любые опухолевые (злокачественные) заболевания органов пищеварения и других локализаций, химиотерапия и лучевая терапия в анамнезе;
- сахарный диабет типа 1;
- указание в первичной медицинской документации на участие на текущий момент (на момент обращения/госпитализации) в каких-либо клинических исследованиях.

**Критерии для контрольной группы:**

- возраст от 18 до 80 лет;
- европеоидная раса;
- отсутствие признаков ХП («определенный» или «вероятный» ХП по классификации M-ANNHEIM [13]);
- отсутствие наследственного/семейного анамнеза ХП, муковисцидоза и рака ПЖ;
- возможность взятия венозной крови для генетического тестирования;
- подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

В обеих группах проводили следующие исследования: физическое исследование, клинические анализы крови и

мочи, биохимический анализ крови, стандартное копрологическое исследование, иммуноферментный метод определения эластазы-1 в кале, эзофагогастродуоденоскопию, УЗИ и (или) компьютерную томографию органов брюшной полости, а также генетическое исследование по идентификации мутации N34S (AAT>AGT) в гене *SPINK1*.

Образцы крови исследовали молекулярно-генетическими методами в лаборатории генетической эпидемиологии (зав. – проф. Р.А. Зинченко) Медико-генетического научного центра РАМН, совместно с доктором биологических наук Н.В. Петровой.

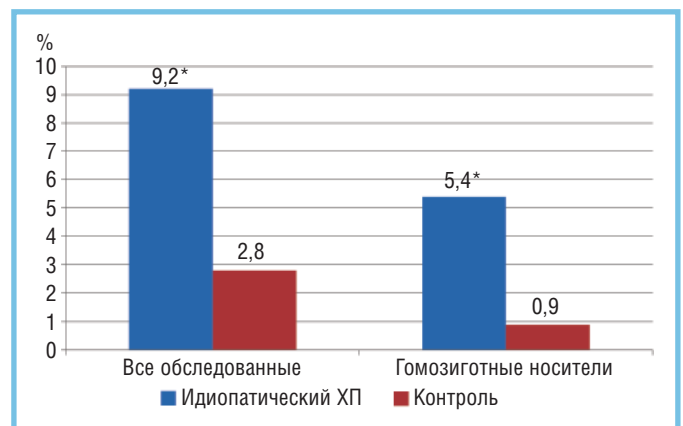
Выделение геномной ДНК у обследованных 2 групп проводили из лейкоцитов венозной крови, идентификацию мутации N34S (AAT>AGT) в гене *SPINK1* – методом рестрикционного анализа: мутация приводит к образованию сайта рестрикции для эндонуклеазы Hpy8I (MjaIV) (аллель 34S). Праймеры: F 5' ACACACAGTATCATTTCTCCCA R 5' TCAAAACATAACACGCATTCAT. Температура отжига 60°C. Амплифицируется фрагмент ДНК – длиной 221 п.н.; далее – рестрикция Hpy8I. В случае аллеля 34S (G) образуются фрагменты длиной 137+84 (п.н.), в случае аллеля N34 (A) – фрагмент 221 п.н. Разделение продуктов рестрикции проводили в полиакриламидном геле; окрашивание бромидом этидия; визуализация в ультрафиолетовом свете.

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом МГМСУ Минздрава России.

Для статистической обработки данных использовали программный пакет БИОСТАТ 4.03 и Statistica release 6.0 for Windows (StatSoft, USA). Полученные результаты расценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

Мутация N34S была выявлена у 22 больных ХП и 3 обследованных контрольной группы, что составило соответственно 9,2 и 2,8%;  $p < 0,05$  (рис. 2). При этом гомозиготных носителей среди больных ХП также оказалось больше – соответственно 5,4 и 0,9% ( $p < 0,05$ ). Мутации одинаково часто встречались у мужчин и женщин, что позволило нам не приводить результаты анализа отдельно с учетом гендерных отличий.

Полученные нами данные о распространенности мутации N34S гена ПИТ в смешанной популяции Москвы и Московской области в целом оказались близки к результатам ряда зарубежных исследователей [14–16]. В общей выборке больных ХП, без учета этиологии заболевания, мутация N34S в гене ПИТ была выявлена у 3,9–4,1% обследованных [17].

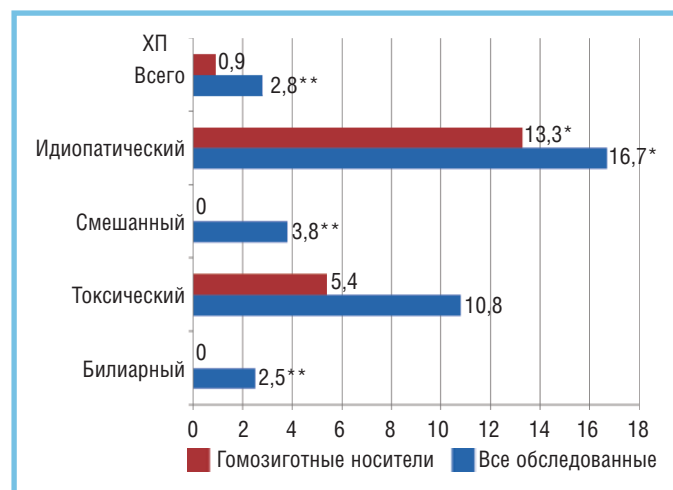


**Рис. 2.** Частота выявленных у больных ХП мутаций N34S; \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем

В связи с большой вариабельностью частоты мутации N34S в разных странах большой интерес для нас представляют работы, выполненные в России или на генетически близких популяциях. В первом случае мы имеем дело с единичными публикациями, показывающими низкую частоту встречаемости этой мутации в смешанной российской популяции – в пределах 1,85–3,06% у больных ХП [18, 19]. С другой стороны, в генетически близких популяциях отмечается существенно более высокая частота встречаемости мутации N34S, достигающая 10% у детей с ХП [16] и 28,6% у взрослых с идиопатическим ХП (в контроле 6,5%) [14]. Возможной причиной пусть небольшого, но все же расхождения данных являются генетическая гетерогенность населения в разных регионах мира, гетерогенность самой формы «ХП», критерии диагностики этого заболевания, применяемые в том или ином исследовании, и т.д. В этой связи весьма любопытным может быть внутрigrупповой анализ частоты мутации N34S у больных с различными этиологическими формами ХП.

В нашем исследовании, включающем смешанное население Москвы и Московской области, частота гомозиготной мутации гена *SPINK1* составила 5,3%, что сопоставимо с большинством исследований в Европе и США. Гомозиготное носительство N34S отмечено только у 1 обследованного контрольной группы (0,9%), что также соответствует данным других исследований (0–2,8%) [20–22]. При этом у указанного обследованного имелась целая совокупность факторов, объясняющих отсутствие у него признаков ХП (возраст 21 год, спортивный образ жизни без употребления алкоголя и курения табака, сбалансированный рацион регулярного питания).

Так, частота мутации у больных билиарнозависимым и смешанным панкреатитом и в контроле была одинаковой, что предполагает доминирование билиарных механизмов в патогенезе этих форм ХП. Наибольшая частота регистрации мутации N34S отмечена у больных токсическим и особенно идиопатическим ХП, достигая 16,7% в целом и 13,3% – для гомозиготных носителей (рис. 3). Действительно, частота мутаций *SPINK1* у больных идиопатическим ХП колеблется в пределах от 6,4% во Франции [23] до 25% в Финляндии [24] и США [15]. Такая вариабельность результатов, безусловно, может быть также объяснена генетическими



**Рис. 3.** Частота выявленной мутации N34S у пациентов с различными этиологическими формами ХП; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* в подгруппах токсического и идиопатического ХП

отличиями изучаемых популяций. Однако более высокая частота регистрации N34S, чем при алкогольном ХП, все же позволяет предполагать, что мутированный ген *SPINK1* ведет себя, скорее, как ген-модификатор болезни. Это отчасти подтверждается результатами исследования, проведенного в Германии и Швейцарии, демонстрирующего прочную ассоциацию генной мутации *SPINK1* и развития «раннего» идиопатического ХП [25].

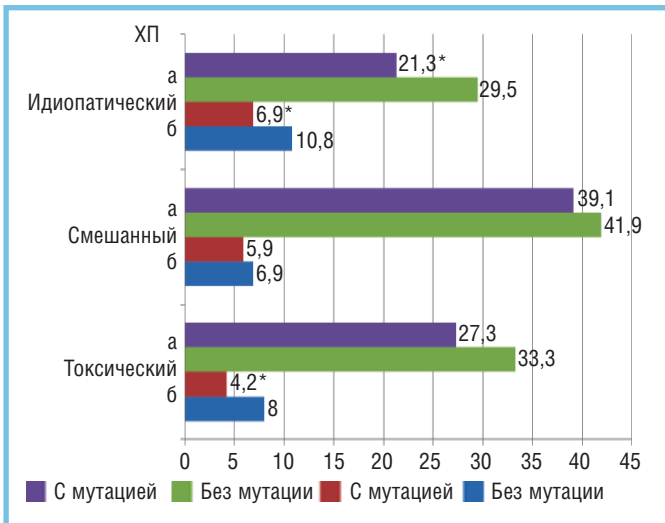
Таким образом, высокая частота регистрации мутации N34S у больных ХП, особенно токсическим и идиопатическим, предполагает значимую роль генетических изменений гена ПИТ в патогенезе ХП у россиян. С другой стороны, в ряде ранее проведенных исследований было показано, что мутация N34S лишь незначительно повышает риск развития ХП у лиц, злоупотребляющих алкоголем, по сравнению с злоупотребляющими им, но без данной мутации [24, 26]. При этом существуют данные, свидетельствующие, что в разных странах Европы и в США эта мутация встречается у 5,8% [27], 7,8% [28], 10% [24] и даже 18% [14] больных алкогольным ХП. Наиболее часто мутация N34S у больных алкогольным ХП отмечается в Индии (26,8%) [29], а реже всего – в Южной Корее (2,4%) [30].

Наиболее значимые особенности течения ХП, исходов заболевания и осложнений в зависимости от наличия мутации N34S представлены на рис. 4, 5. Какой-либо зависимости наличия единственной мутации N34S в группе больных билиарнозависимым ХП нами не отмечено, что позволило не приводить эти данные.

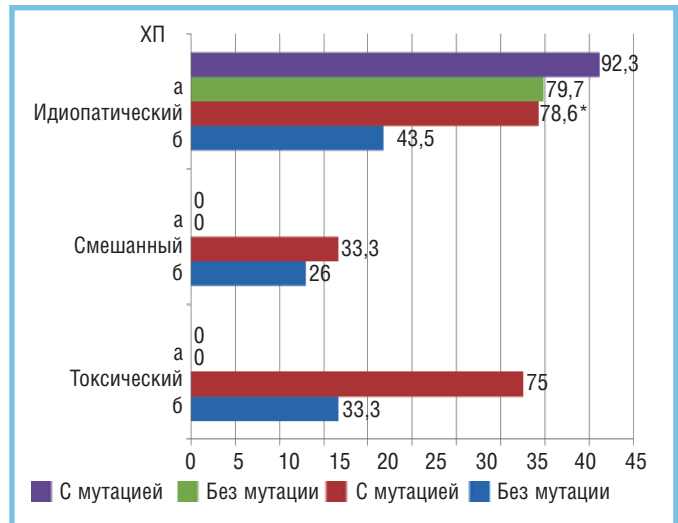
Необходимо отметить отсутствие какой-либо взаимосвязи мутации N34S с течением билиарнозависимого ХП. Указанная мутация встречалась при достоверно меньшей длительности анамнеза ХП, особенно у больных алкогольным ХП, что сказалось на достоверном снижении возраста манифестации идиопатического ХП. Действительно, уже 10 лет известно, что у 20–40% пациентов с ранним началом идиопатического ХП возможны мутации гена *SPINK1* [15], приводящие к дисфункции этого белка и, как следствие, к возможности неконтролируемой интрапанкреатической активации трипсина [2].

Остается спорным и вопрос о влиянии мутации N34S в гене *SPINK1* на клиническое течение ХП. Настоящее исследование с относительно небольшим числом наблюдений и отсутствием длительного проспективного наблюдения не способно убедительно подтвердить ассоциации между наличием изучаемой мутации и тяжестью течения ХП [20, 31], а также возрастом начала манифестации болезни [15]. Корреляционный анализ, проведенный нами между выраженностью симптомов ХП (боль, диарея, стеаторея, ситофобия, трофологическая недостаточность) и наличием гомо- или гетерозиготного носительства мутации N34S, не выявил какой-либо зависимости. Однако большая частота встречаемости мутации N34S у больных с осложненными формами идиопатического ХП предполагает повышение риска развития осложнений. У больных идиопатическим ХП с наличием мутации N34S чаще выявляли выраженный фиброз ПЖ с объемным уменьшением паренхимы органа (различия недостоверны). Нам удалось выявить более высокую и статистически значимую частоту мутации N34S у больных ХП с наличием кальцинатов при отсутствии взаимосвязи с панкреатической недостаточностью, что было отмечено ранее в отдельных исследованиях [25].

Учитывая, что у больных билиарнозависимым и смешанным ХП мутация N34S встречалась с частотой, сопоставимой



**Рис. 4.** Возраст клинической манифестации ХП (а) и длительность анамнеза (б) в зависимости от наличия мутации N34S, годы; \* $p < 0,05$  между подгруппами с наличием мутации и без таковых



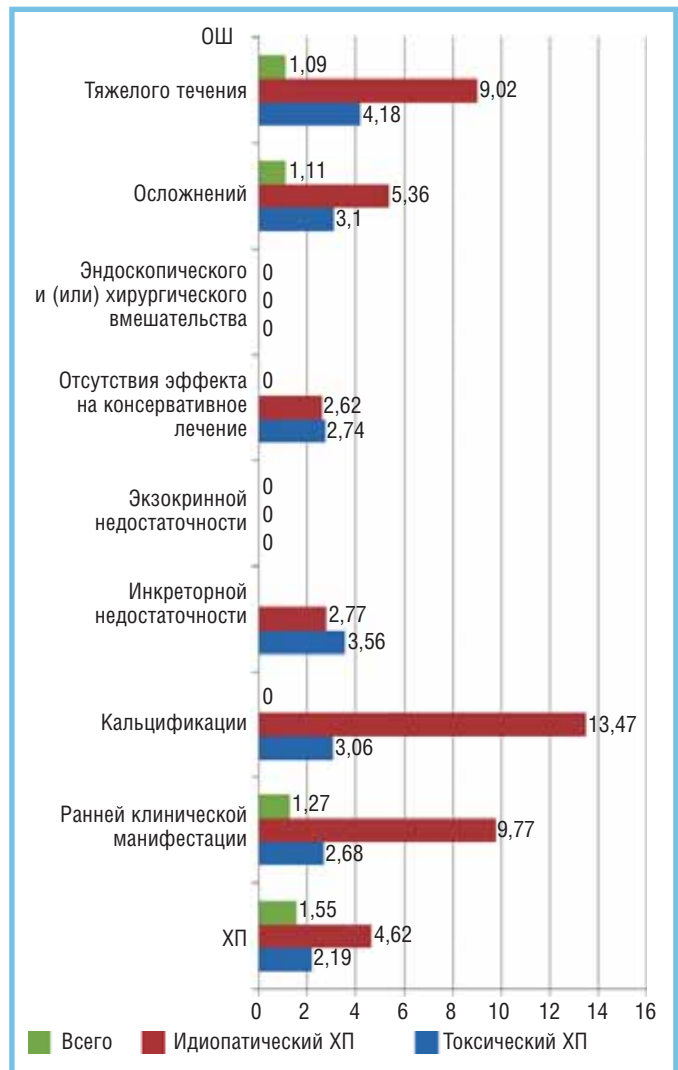
**Рис. 5.** Частота выраженного фиброза (%) с уменьшением объема ПЖ (а) и осложнений (б); \* $p < 0,05$  между подгруппами с наличием мутаций и без таковых

с таковой в контроле, а предшествующий анализ не установил каких-либо взаимосвязей с течением ХП, дальнейший анализ рисков (ОШ) проведен в подгруппах больных с алкогольным и идиопатическим ХП (рис. 6). Наличие мутации N34S определяет низкий риск развития ХП любой этиологии, умеренный риск токсического и высокий – идиопатического ХП; низкий риск ранней клинической манифестации ХП любой этиологии, умеренный риск для токсического и высокий – для идиопатического ХП. Полученные нами данные условно укладываются в наиболее доказательные результаты крупного метаанализа 24 исследований, включающих 2421 случай ХП (контроль – 4857 случаев), свидетельствующие о высоком риске развития ХП у носителей мутации N34S: ОШ развития ХП достигает 11,00 (95% доверительный интервал (ДИ) 7,59–15,93); для идиопатического ХП риск еще выше – 14,97 (95% ДИ 9,09–24,67) [32].

Нами также отмечен умеренный риск низкой эффективности консервативного лечения (комбинированной фармакотерапии) для токсического ХП (ОШ=2,74) и идиопатического ХП (ОШ=2,62); крайне низкий риск развития осложнений для ХП любой этиологии (ОШ=1,11), умеренный риск для токсического ХП (ОШ=3,10) и более высокий – для идиопатического ХП (ОШ=5,36); крайне низкий риск тяжелого течения ХП любой этиологии (ОШ=1,11), умеренный риск тяжелого течения для токсического ХП (ОШ=4,18) и высокий умеренный риск – для идиопатического ХП (ОШ=9,02).

Наличие мутации не сказалось на риске кальцификации для ХП любой этиологии, однако установлен умеренный риск для токсического ХП (ОШ=3,06) и высокий – для идиопатического ХП (ОШ=13,47). Нами также отмечено отсутствие риска развития инкреторной недостаточности для ХП любой этиологии, умеренный риск для токсического ХП (ОШ=3,56) и идиопатического ХП (ОШ=2,77); отсутствие риска развития внешнесекреторной недостаточности для ХП любой этиологии; отсутствие риска эндоскопического и (или) хирургического вмешательства для ХП любой этиологии.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что ХП – гетерогенное заболевание, на развитие и течение ко-



**Рис. 6.** Риск (ОШ) развития ХП, особенностей его течения и осложнений в зависимости от наличия мутации N34S



того оказывают влияние различные экзогенные (курение, злоупотребление алкоголем) и эндогенные (патология билиарного тракта, генетическая предрасположенность) факторы. Большое значение в развитии предрасположенности к ХП у курильщиков и лиц, злоупотребляющих алкоголем, играет мутация N34S, определяя более быстрое развитие ХП, большую вероятность осложнений, тяжелого течения и худшего ответа на консервативное лечение. Наиболее специфичной оказалась группа идиопатического ХП, в которой отмечены максимальная частота данной мутации, наиболее тяжелое и осложненное течение ХП, большой риск неблагоприятных исходов.

Хотя роль мутаций гена ПИТ в развитии ХП оценена в нескольких западных исследованиях [14–17, 32, 33], наше исследование – первое, в котором изучалась частота мутации N34S у больных ХП в Москве и Московской области, и пока единственное в России, в котором удалось доказать, что данная мутация играет существенную роль в развитии по крайней мере токсического и идиопатического панкреатита.

Таким образом, мутации гена *SPINK1*, ассоциированные с ХП, были обнаружены при всех (за исключением аутоиммунного ХП) формах заболевания. Поскольку мутация N34S нередко встречается у лиц без ХП, маловероятно, что только наличие гомозиготного носительства определяет развитие ХП. Скорее всего, у большинства пациентов со *SPINK1*-ассоциированным ХП данная мутация действует как модификатор болезни либо в составе многогенной модели вместе с другими неидентифицированными генетическими, экзогенными и экологическими кофакторами развития ХП.

Список литературы см. на сайте редакции [www.rusvrach.ru](http://www.rusvrach.ru).

#### SIGNIFICANCE OF N34S MUTATION IN THE *SPINK1* GENE IN CHANGING THE CLINICAL COURSE OF CHRONIC PANCREATITIS

*Yu. Kucheryavii*<sup>1</sup>, Candidate of Medical Sciences; *Z. Tibilova*<sup>1</sup>; *D. Andreev*<sup>1</sup>; *A. Smirnov*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

<sup>2</sup>Polyclinic Two, Ministry of Economic Development of Russia, Moscow

*The investigation showed that the N34S mutation in the SPINK1 gene (a pancreatic secretory trypsin inhibitor gene) was most common in patients with toxic and idiopathic chronic pancreatitis (CP). The significantly high rate of identification of the above mutation in patients with complicated forms of idiopathic CP suggests the increased risk of disease complications.*

**Key words:** chronic pancreatitis, mutations, pancreatic secretory trypsin inhibitor, *SPINK1*, N34S.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

**О. Видулова**<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,

**А. Железнякова**<sup>1</sup>,

**В. Носиков**<sup>2</sup>, доктор медицинских наук,

**М. Шестакова**<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор

<sup>1</sup>Эндокринологический научный центр, Москва

<sup>2</sup>Государственный научный центр «ГосНИИ генетика», Москва

**E-mail:** [azhelez@gmail.com](mailto:azhelez@gmail.com)

*Оценено влияние генетических факторов на риск развития хронической болезни почек (ХБП) у пациентов с сахарным диабетом типа 2. Выявлена достоверная ассоциация ХБП с полиморфизмом генов (продукты которых играют определяющую роль в патогенезе поражения почек), кодирующих продукцию вазоактивных факторов эндотелия (ген NOS3) и факторы липидного обмена (ген APOB).*

**Ключевые слова:** сахарный диабет типа 2, хроническая болезнь почек, генетика осложнений, ген *NOS3*, ген *APOB*.

Особенностью изучения генетики почечных осложнений у пациентов с сахарным диабетом типа 2 (СД2) является гетерогенность патологии почек при этом типе заболевания, что практически не позволяет дифференцировать классическую диабетическую нефропатию (ДН), основанную на определении альбуминурии, как при СД типа 1 (СД1). В настоящее время с целью диагностики почечной патологии введено понятие хронической болезни почек (ХБП) [3]. Под ХБП понимают наличие одного или более лабораторных, структурных или функциональных признаков повреждения почек длительностью  $\geq 3$  мес или изолированное снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ)  $< 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Таким образом, ХБП – обобщающее наднозологическое понятие, которое в целом отражает вовлеченность почек в патологический процесс, что позволяет оценить наличие их поражения вне зависимости от причины повреждения. Наряду с такими заболеваниями, как СД и ожирение, ХБП рассматривается в качестве «третьей пандемии XXI века». ХБП развивается в общей популяции у 13–15% лиц и гораздо чаще (до 60%) – в группах риска, к которой относятся пациенты с СД2, что может указывать на наличие генетической детерминированности данной патологии [4].

В патогенезе патологии почек важнейшую роль играют эндотелиальная дисфункция, ведущая к нарушению синтеза вазопротективных и антитромбогенных факторов, а также изменения липидного спектра крови, промотирующие повреждение эндотелия и формирование гломерулосклероза, а следовательно, развитие ХБП. Поэтому для нас наибольший