



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

УТИЦАЈ ГЕНЕТСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА ПАНКРЕАСНИХ ЕНЗИМА И МЕДИЈАТОРА ЗАПАЉЕЊА НА ТОК И ИСХОД АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

### Кључне речи :

Акутни панкреатитис · генетски полиморфизам · панкреасни протеини · медијатори запаљења

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

Акутни панкреатитис представља акутно запаљење панкреаса, које настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и превремене активације протеолитичких проензима. Досадашња истраживања су показала да на настанак, тежину и исход овог обољења, између осталог, у одређеној мери могу утицати и варијације гена који кодирају панкреасне протеине и медијаторе запаљења.

Циљ предложене студије је утврђивање повезаности најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози, факторе некрозе тумора  $\alpha$  и  $\beta$  и интерлеукине 6, 8, 10 и 18 са настанком компликација или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом. Студија ће бити ретроспективно-проспективна, типа случај-контрола, а укључиће пацијенте лечене од акутног панкреатитиса у Клиничком центру Крагујевац у претходних 5 и наредне 2 године. Генотипизација ће се спроводити алел-специфичном PCR методом и PCR методом уз примену рестрикционих ензима, док ће се као показатељи тока и исхода акутног панкреатитиса пратити вредности АРАСНЕII скорa, смртни исход, некроза панкреаса, инфекција некрозе, псеудоциста панкреаса и вредности рутинских хематолошких и биохемијских тестова.

Очекује се да студија покаже да испитивани генетски полиморфизам утиче на ток и исход акутног панкреатитиса, и тиме укаже на значај генотипизације као раног маркера тежине очекиване клиничке слике.



### Циљ истраживања

Главни циљ предложене студије је утврђивање повезаности најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе, факторе некрозе тумора  $\alpha$  и  $\beta$  и интерлеукине 6, 8, 10 и 18 са настанком компликација или смртог исхода акутног панкреатитиса. Генотипизација ће обухватити најзначајније варијације кодирајућих гена, и то: 1) PRSS1: 365G>A (rs77914057), 86A>T (rs111033566); 2) SPINK1: 101A>G (rs17107315); 3) CFTR: 1408G>A (rs213950), IVS8-5T (rs73715573/rs10229820), 350G>A (rs78655421); 4) TNF- $\alpha$ : -238G>A (rs361525), -308G>A (rs1800629); 5) TNF- $\beta$ : NcoI; 6) IL-6: -174G>C (rs1800795), -634G>C (rs1800796); 7) IL-8: -251T>A (rs4073); 8) IL-10: -1082G>A (rs1800896); 9) IL-18: -137G>C (rs187238), -607A>C (rs1946518).

### Актуелност истраживања

Акутни панкреатитис настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и активације протеолитичких проензима унутар панкреаса (1), у чему значајну улогу игра велики број различитих ензима и цитокина. Неки од њих испољавају генетски полиморфизам, што може представљати фактор ризика за развој теже клиничке слике и неповољан исход. У најзначајније полиморфне протеине са потенцијалом утицаја на развој и ток акутног панкреатитиса могу се убројити:

- Катјонски трипсиноген (PRSS1) - најзаступљенија изоформа најзначајнијег панкреасног проензима трипсиногена. Ген који кодира катјонски трипсиноген је полиморфан, а у најзначајније варијације спадају 365G>A, који трипсин чини отпорним на аутолизу и трајно активним, и 86A>T, који отежава инхибицију трипсина (2).
- Инхибитор панкреасног трипсина (SPINK1) - спречава прерану активацију трипсиногена и последичну панкреасну аутодигестију. Најзначајнија варијација кодирајућег гена је 101A>G, а њено присуство повећава ризик од настанка панкреатитиса, нарочито у комбинацији са другим генетским и/или негенетским факторима ризика (3).
- Регулатор трансмембранске спроводљивости у цистичној фибрози (CFTR) - омогућава секрецију бикарбоната те побољшава проток панкреасног сока. До данас је познато преко 1200 различитих варијанти гена који кодира CFTR, а у најзначајније се убрајају 1408G>A, 350G>A, 1522\_1524delTTT и интронска варијација 5T, за које се сматра да могу утицати на количину функционалног протеина CFTR, као и на ток панкреатитиса (1, 2).
- Фактор некрозе тумора  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) - у току тешког акутног панкреатитиса продукује се у многим органима и његов ниво корелира са тежином клиничке слике. Ген који га кодира полиморфан је, а нека досадашња истраживања (1, 4, 5), али не сва (6), указала су на могућу повезаност полиморфизама -308G>A и -238A>G са тежином клиничке слике панкреатитиса.
- Фактор некрозе тумора  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) - испољава сличне ефекте као TNF- $\alpha$ , а варијација кодирајућег гена NcoI заступљенија је код пацијената оболелих од акутног панкреатитиса праћеног септичним шоком (4).



- Интерлеукин 6 (IL-6) - проинфламаторни цитокин који регулише акутну фазу запаљења (7, 8). Као функционално најзначајније варијације кодирајућег гена издвајају се -174G>C и -634G>C (9). Иако се зна да ниво IL-6 корелира са тежином клиничке слике акутног панкреатитиса (8), утицај генетског полиморфизма на ток и исход овог обољења још увек није потпуно разјашњен (5).
- Интерлеукин 8 (IL-8) - активира неутрофиле током запаљења. Његова концентрација током акутног панкреатитиса расте, нарочито уколико је пацијент носилац варијације -251T>A кодирајућег гена, која чини генетску предиспозицију за развој теже клиничке слике (10).
- Интерлеукин 10 (IL-10) - анти-инфламаторни цитокин који супримира ћелијски одговор на запаљење. Међу варијацијама кодирајућег гена истиче се -1082G>A, која доводи до смањења продукције функционалног протеина, а показала се учесталијом код пацијената оболелих од тешког акутног панкреатитиса праћеног септичним шоком (11).
- Интерлеукин 18 (IL-18) - модулатор имуног одговора и један од кључних медијатора запаљења у акутном панкреатитису (12). Ген који кодира IL-18 такође је полиморфан, а неколицина његових варијација, укључујући -137G>C и -607A>C, доведена је у везу са склоношћу ка одређеним обољењима и/или серумском концентрацијом цитокина (13). О утицају генетског полиморфизма IL-18 на ток и исход акутног панкреатитиса за сада се мало зна.

### Предмет и опис истраживања:

#### задачи, методологија, очекивани резултати

Предложена студија ретроспективно-проспективна типа случај-контрола. Студијска популација биће пацијенти Јединице интензивног лечења, Клинике за хирургију и Ургентног центра Клиничког центра Крагујевац, лечени од акутног панкреатитиса. У студију ће бити укључени пацијенти који задовоље све критеријуме за укључивање, и то: потврђена дијагноза акутног панкреатитиса и хоспитализација у Јединици интензивног лечења, на Клиници за хирургију или у Ургентном центру Клиничког центра Крагујевац. Пацијенти неће бити укључени у студију уколико задовоље макар један од критеријума за искључивање, и то: млађи од 16 година, пацијенти са постоперативним акутним панкреатитисом, труднице и пацијенти преведени из других установа у Клинички центар Крагујевац касније од 48 сати од почетка болести. Из студијске популације ће као случајеви бити изабрани сви хоспитализовани пацијенти са акутним панкреатитисом у последњих 5 и наредне 2 године, код којих је дошло до некрозе панкреаса, инфекције некрозе панкреаса, настанка псеудоцисте и/или смртог исхода. За сваки студијски случај ће из преосталих чланова студијске популације бити изабрани пацијенти истог пола и сличне старости ( $\pm 1$  година) а без наведених компликација и/или смртог исхода. Од изабраних пацијената методом случајног избора за сваки студијски случај биће издвојене по две контроле.

У овој студији ће се као независне варијабле пратити варијације гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе, факторе некрозе тумора  $\alpha$  и  $\beta$  и интерлеукине 6, 8, 10 и 18, и то: 1) PRSS1: 365G>A (rs77914057), 86A>T (rs111033566); 2) SPINK1: 101A>G (rs17107315); 3) CFTR: 1408G>A (rs213950), IVS8-5T (rs73715573/rs10229820), 350G>A (rs78655421); 4) TNF-



$\alpha$ : -238G>A (rs361525), -308G>A (rs1800629); 5) TNF- $\beta$ : NcoI; 6) IL-6: -174G>C (rs1800795), -634G>C (rs1800796); 7) IL-8: -251T>A (rs4073); 8) IL-10: -1082G>A (rs1800896); 9) IL-18: -137G>C (rs187238), -607A>C (rs1946518).

Узимање узорка крви за генотипизацију изводиће се по пријему пацијента, након процене подобности за укључење у студију и потписивања формулара Информисаног пристанка. Од испитаника ће бити узето 10ml крви у епрувету са антикоагулансом EDTA. Пуна крв ће се чувати на -20°C до извођења анализа. Генотипизација ће се спроводити методом PCR уз примену рестрикционих ензима (енгл. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) у PCR лабораторији Медицинског факултета у Крагујевцу, методама описаним у литератури (3-7, 9, 10, 13-17).

Као зависне варијабле пратиће се показатељи тока и исхода акутног панкреатитиса, и то: 1) вредности АРАСНЕП скорa (у првих 48 сати од пријема); 2) смртни исход (на основу потврде о смрти из историје болести пацијента); 3) некроза панкреаса (СТ прегледом са контрастом или нуклеарном магнетном резонанцом); 4) инфекција некрозе (аспирацијом места некрозе танком иглом или присуством мехурића гаса на СТ прегледу); 5) псеудоциста панкреаса (СТ прегледом); 6) вредности рутинских хематолошких тестова - хематокрит, број еритроцита, леукоцита, тромбоцита, леукоцитарна формула, МСНС, МСН и МCV (увидом у историју болести пацијента); 7) вредности рутинских биохемијских тестова - гликемија, уреа, креатинин, билирубин укупни и директни, аминотрансферазе, алкална фосфатаза, амилаза, липаза, натријум, калијум, калцијум, хлор, бикарбонати, рН крви, С-реактивни протеин и прокалцитонин (увидом у историју болести пацијента).

Од предложене студије се очекује да покаже да испитивани генетски полиморфизам утиче на ток и исход акутног панкреатитиса, и тиме укаже на значај генотипизације као раног маркера тежине очекиване клиничке слике.

### **Значај истраживања**

Тежину клиничке слике акутног панкреатитиса у највећој мери одређује активност панкреасних протеина који врше аутодигестију панкреаса и медијатори запаљења који управљају инфламаторним одговором. Неке од њих кодирају полиморфни гени, а досадашња истраживања указала су на то да присуство или одсуство одређених генетских варијација може представљати фактор ризика за развој теже клиничке слике и неповољан исход. Уколико се повезаност између генотипа и клиничке слике докаже, генотипизација би могла да постане један од маркера тежине очекиване клиничке слике, па чак и дијагностичка и прогностичка метода избора у акутном панкреатитису.

### **Временски оквир**

Студија ће бити започета након добијања сагласности Медицинског факултета у Крагујевцу. Према статистичкој процени заснованој на резултатима претходних истраживања (18), у студију треба да буде укључено укупно 144 пацијената. Трајање студије зависиће од броја доступних пацијената који задовољавају критеријуме за укључивање.



## Литература

1. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. *Annu Rev Med.* 2010;61:413-24.
2. Khan AS, Latif SU, Eloubeidi MA. Controversies in the etiologies of acute pancreatitis. *Jop.* 2010;11(6):545-52.
3. 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(7):543-6.
4. 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(2):138-43.
5. 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(3):295-301.
6. Ozhan G, Yanar HT, Ertekin C, et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) gene in patients with acute pancreatitis. *Mediators Inflamm.* 2010;doi:10.1155/2010/482950.
7. Ng DPK, Nurbaya S, Ye S, et al. An IL-6 haplotype on human chromosome 7P21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2008;74(4):521-527.
8. Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas.* 1997;14(1):1-8.
9. Lieb W, Pavlik R, Erdmann J, et al. No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with myocardial infarction or traditional cardiovascular risk factors. *Int J Cardiol.* 2004;97:205-212.
10. 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. *Pancreatology.* 2006;6(6):542-8.
11. 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(28):4409-13.
12. Yuan BS, Zhu RM, Braddock M, et al. Interleukin-18: a pro-inflammatory cytokine that plays an important role in acute pancreatitis. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(10):1261-71.
13. Pawlik A, Kurzawski M, Drozdziak M, et al. Interleukin-18 gene (IL18) promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2009;38:159-165.
14. Mora J, Comas L, Ripoll E, et al. Genetic mutations in a Spanish population with chronic pancreatitis. *Pancreatology.* 2009;9:644-651.
15. Masamune A, Ariga H, Kume K, et al. Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(6):974-8.
16. Qiao D, Yi L, Hua L, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene 5T allele may protect against prostate cancer: A case-control study in Chinese Han population. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2008;7:210-214.
17. Shrimpton AE. R117H and IVS8-5T cystic fibrosis mutation detection by restriction enzyme digestion. *Molecular Diagnosis.* 2000;5(3):235-238.
18. 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(2):e46-50.