

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА 279 G/A ГЕНА БЕЛКА-ПЕРЕНОСЧИКА ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА В РАЗВИТИИ ОСТРОГО НЕБИЛИАРНОГО ПАНКРЕАТИТА

© Животова Г.В.¹, Самгина Т.А.¹, Бушуева О.Ю.², Назаренко П.М.¹, Полоников А.В.²

¹ Кафедра хирургических болезней № 2, ² кафедра биологии, медицинской генетики и экологии
Курского государственного медицинского университета, Курск
E-mail: tass@list.ru

Целью исследования было изучение ассоциации полиморфизма 279 G/A гена *CETP* с риском развития острого небилиарного панкреатита в русской популяции. Образцы цельной крови были собраны у 281 больного острым панкреатитом и 200 здоровых. Генотипирование полиморфизма 279 G/A гена *CETP* выполнено с помощью метода ПЦР с дискриминацией аллелей с помощью TaqMan-зондов. В проведенном нами исследовании статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма 279 G/A гена *CETP* между группами здоровых индивидов и больных острым небилиарным панкреатитом не установлено. Нами был проведен стратифицированный анализ по полу, среди курящих пациентов – различий в группах больных и здоровых лиц получено не было. Поскольку среди факторов риска развития острого панкреатита особое место занимает злоупотребление алкогольными напитками, нами было изучено влияние объема напитка (до 199 г и 200 г и более чистого этанола в неделю), частота его употребления (2 и менее раз в месяц и более 1 раза в неделю) и длительность, т.е. алкогольный анамнез (до 10 лет и более 10 лет). Было обнаружено, что объем и частота приема алкогольных напитков не меняли общей картины ассоциации генотипов с риском развития острого небилиарного панкреатита.

Ключевые слова: острый панкреатит, нарушение липидного обмена, полиморфизм 279 G/A гена *CETP*.

STUDYING THE ROLE OF 279 G/A CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN GENE POLYMORPHISM IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE PANCREATITIS

Zhivotova G.V.¹, Samgina T.A.¹, Bushueva O.Yu.², Nazarenko P.M.¹, Polonikov A.V.²

¹ Department of Surgical Diseases N 2, ² Department of Biology, Medical Genetics and Ecology
of Kursk State Medical University, Kursk

The aim of the study was to investigate the association of 279 G/A polymorphism of *CETP* gene with the risk for acute pancreatitis in Russian population. Whole blood samples were collected from 281 patients with acute pancreatitis and 200 healthy people. Polymorphism Genotyping 279 G/A *CETP* gene was accomplished by using PCR with allele discrimination with TaqMan-probes. There is no association of polymorphisms of 279 G/A *CETP* gene with the development of acute nonbiliary pancreatitis. We conducted a stratified analysis by sex, among smokers - no differences were found in the groups of patients and healthy individuals. Since alcohol abuse takes a particular place among the risk factors for acute pancreatitis, we studied the effect of the drink volume (up to 199g and 200g and > pure ethanol per week), the frequency of its consumption (2 or less times a month and more than once a week), and duration (up to 10 years and more than 10 years). It was found that the volume and frequency of taking alcoholic beverages did not change the general picture of the association of genotypes with the risk for developing acute pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis, disturbance of lipid metabolism, polymorphism 279G/A *CETP* gene.

Острый панкреатит (ОП) – острое хирургическое заболевание поджелудочной железы, в основе которого лежит первичный отек или асептический некроз паренхимы железы с возможным развитием инфицирования железы и брюшинной клетчатки и, согласно современным представлениям об этиопатогенезе, представляет собой мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и различных факторов внешней среды [1]. Вопросы, касающиеся генетических механизмов ОП и его осложнений, изучены пока недостаточно [1, 10]. Ведущая роль в патогенезе токсемии при остром панкреатите принадлежит ферментам поджелудочной железы (трипсин, липаза, фосфолипаза А2, лизосомные ферменты), которые вызывают дистресс-синдром,

тромбоз капилляров, гипоксию, ацидоз, гиперметаболизм, повреждение мембран клеток и эндотелия. Развивающийся при ОП липолитический некроз ПЖЖ, брюшинной клетчатки, брыжейки тонкой и толстой кишки свидетельствует о нарушении жирового обмена [5, 11]. Основным белком, участвующим в метаболизме липидов и обеспечивающим обратный транспорт холестерина, является белок-переносчик эфиров холестерина – СЕТР, который обладает двойственной функцией и может проявлять как анти-, так и проатерогенные свойства [8]. В этой связи гены-регуляторы липидного обмена рассматриваются как потенциальные гены-кандидаты при тестировании предрасположенности к ОП. Одним из ключевых генов липидного обмена является ген белка-переносчика эфиров холестерина (*CETP*).

Целью исследования было изучение ассоциации полиморфизма 279 G/A гена *CETP* с риском развития острого небилиарного панкреатита в русской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные от 281 неродственного больного острым небилиарным панкреатитом (75 женщин и 206 мужчин) русской национальности, находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях города Курска в период с 2012-го по 2015-й год, и 200 неродственных индивидов русской национальности без заболеваний ЖКТ (54 женщины и 146 мужчин). Средний возраст больных составил $48,9 \pm 13,1$, здоровых лиц – $47,8 \pm 12,1$.

Диагноз ОП устанавливался с использованием современной классификации острого панкреатита, разработанной Российским обществом хирургов в 2014 г. с учетом классификации Атланта-92 и ее модификаций, предложенных в г. Кочин в 2011 г. Международной ассоциацией панкреатологов (International Association of Pancreatology) и Международной рабочей группой по классификации острого панкреатита (Acute Pancreatitis Classification Working Group) в 2012 г., с использованием общеклинических, лабораторных (общий и биохимический анализ крови) и инструментальных (УЗИ и МРТ поджелудочной железы, ЭФГДС) методов исследования.

У всех обследуемых проводился забор венозной крови для проведения молекулярно-генетического анализа и биохимических исследований. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма 279 G/A гена *CETP* проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96Bio-Rad Laboratories (США) с использованием коммерческих наборов реактивов TaqMan SNP Genotyping Assays фирмы Applied Biosystems (США).

Повторное генотипирование 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу и при отсутствии информации о статусе болезни, показало 100% воспроизводимость оригинальных результатов. Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов гена *CETP* с риском развития ОП использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95% доверительными интервалами (CI). Статистический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 6.0 ("StatSoft", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма 279 G/A гена *CETP* представлены в таблице 1. Генотипы исследуемого полиморфизма находились в соответствии с распределением Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Как видно из таблицы 1, ассоциации изучаемого полиморфизма гена *CETP* с развитием острого небилиарного панкреатита (ОП) не обнаружено.

Нами был проведен стратифицированный анализ по полу, среди курящих пациентов – различий в группах больных и здоровых лиц получено не было. Поскольку среди факторов риска развития острого панкреатита особое место занимает злоупотребление алкогольными напитками, нами было изучено влияние объема напитка (до 199 г и 200 г и > чистого этанола в неделю), частота его употребления (2 и менее раз в месяц и более 1 раза в неделю) и длительность, т.е. алкогольный анамнез (до 10 лет и более 10 лет). Было обнаружено, что объем и частота приема алкогольных напитков не меняла общей картины ассоциации генотипов с риском развития острого небилиарного панкреатита.

Изучение полиморфизмов генов регуляции липидного обмена – одно из направлений интенсивных исследований в раскрытии патогенетических механизмов развития и течения заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе и заболеваний поджелудочной железы [2].

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма 279 G/A гена *CETP*
в группах больных острым небилиарным панкреатитом и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОНП		Здоровые лица		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n	%	n	%		
Сравнение групп больных ОНП(n=281) и здоровых лиц (n=200)						
G/G	87	31.0	68	34.0	0.49(0.48)	1.15(0.78-1.69)
G/A	137	48.8	103	51.5	0.35(0.55)	0.90(0.62-1.29)
A/A	57	20.3	29	14.5	2.66(0.10)	1.50(0.92-2.45)
G	0.553		0.598		1.86(0.17)	1.20(0.92-1.55)
A	0.447		0.403			

ЛИТЕРАТУРА

В регуляцию метаболизма ЛПВП вовлечен белковый транспортер эфиров холестерина плазмы крови (СЕТР – cholesteryl ester transfer protein), осуществляющий перенос эфиров холестерина из состава ЛПВП во фракцию липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Поскольку функция СЕТР ориентирована на понижение содержания холестерина в составе ЛПВП в плазме, избыточная транспортная активность либо гиперпродукция данного белка в крови может предрасполагать к развитию связанных с нарушением жирового обмена заболеваний. Белковый транспортер эфиров холестерина кодируется геном СЕТР, расположенном на хромосоме 16q12-q21 и состоящем из 15 интронов и 16 экзонов. В гене СЕТР и прилегающих к нему областях найдено свыше 700 полиморфных участков, из которых наиболее хорошо изучен полиморфизм Таq1В, расположенный в интроне 1 гена СЕТР. Для аллеля Таq1В2, характеризующегося отсутствием участка узнавания рестриктазы ТаqI, обнаружена ассоциация со сниженным риском сердечно-сосудистых заболеваний, пониженной транспортной активностью белка СЕТР и повышенным содержанием холестерина в составе ЛПВП в плазме крови [9].

Исследования структуры блоков неравновесия по сцеплению в гене СЕТР показали, что у европеоидов имеет место слабо выраженное сцепление полиморфного участка Таq1В с полиморфизмом Пе405Val, расположенным в экзоне 14 [4]. Полиморфизм Таq1В находится в протяженном блоке сцепления длиной порядка 1000 п.н., расположенном в 5'-концевой части гена СЕТР и охватывающем промоторную область, экзон 1 и начало интрона 1. В промоторной области гена СЕТР так же обнаружены два полиморфных маркера С (–724)Т и С(–629)А [3]. Как и для аллеля А полиморфного участка Таq1В, для минорных аллелей обоих полиморфных маркеров в промоторном участке гена СЕТР выявлена достоверная связь с пониженным содержанием белкового транспортера эфиров холестерина и повышенным уровнем холестерина в составе ЛПВП и аполипопротеина А1 в плазме [6]. В случае маркера С (–629)А наблюдаемые ассоциации могут быть объяснены функциональным эффектом аллеля А, понижающим транскрипционную активность промотора СЕТР вследствие нарушения связывания факторов транскрипции Sp1 и/или Sp3 [7].

В проведенном нами исследовании статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма 279 G/A гена *CETP* между группами здоровых индивидов и больных острым небилиарным панкреатитом не установлено.

1. Горский В.А., Ковальчук Л.В., Агапов М.А. Антимедиаторная терапия в комплексном лечении острого деструктивного панкреатита // Хирургия. – 2010. – № 3. – С. 54-61.
2. Самгина Т.А., Полоников А.В., Бушуева О.Ю., Назаренко П.М. Связь полиморфизма HindIII гена липопротеинлипазы с развитием острого небилиарного панкреатита: пилотное исследование // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 1. – С. 92-96.
3. Bauerfeind A., Knoblauch H., Schuster H. Single nucleotide polymorphism haplotypes in the cholesteryl-ester transfer protein (CETP) gene and lipid phenotypes. // Hum. Hered. – 2002. – Vol. 54, N 4. – P. 166-173.
4. Boekholdt S.M., Thompson J.F. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. // J Lipid Res. – 2003. – Vol. 44, N 6. – P. 1080-1093.
5. Cho S.M., Shin S., Lee K.A. PRSS1, SPINK1, CFTR, and CTRE Pathogenic Variants in Korean Patients With Idiopathic Pancreatitis // Ann Lab Med. – 2016. – Vol. 36, N 6. – P. 555-560. – doi: 10.3343/alm.2016.36.6.555.
6. Corbex M., Poirier O., Fumeron F., Betoulle D., Evans A., Ruidavets J.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Cambien F. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction // Genet Epidemiol. – Vol. 19, N 1. – P. 64-80.
7. Dacht C., Poirier O., Cambien F., Chapman J., Rouis M. New functional promoter polymorphism, CETP/-629, in cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene related to CETP mass and high density lipoprotein cholesterol levels: Role of Sp1/Sp3 in transcriptional regulation // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2015. – Vol. 20, N 2. – P. 507-515.
8. Hassanzadeh T., Firoozrai M., Zonouz A.E., Zavarehee A., Paoli M. Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in primary combined hyperlipidaemia // Indian J Med Res. – 2009. – Vol. 129, N 3. – P. 293-298.
9. Kuivenhoven J.A., de Grooth G.J., Kawamura H., Klerkx A.H., Wilhelm F., Trip M.D., Kastelein J.J. Effectiveness of inhibition of cholesteryl ester transfer protein by JTT-705 in combination with pravastatin in type II dyslipidemia // Am J Cardiol. – 2005. – Vol. 95, N 9. – P. 1085-1088.
10. LaRusch J., Whitcomb D.C. Genetics of pancreatitis // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 27, N 5. – P. 467-474. – doi: 10.1097/MOG.0b013e328349e2f8.
11. Wang W., Sun X.T., Weng X.L., Zhou D.Z., Sun C., Xia T., Hu L.H., Lai X.W., Ye B., Liu M.Y., Jiang F., Gao J., Bo L.M., Liu Y., Liao Z., Li Z.S. Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTRE and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study // BMJ Open. – 2013. – Vol. 3, N 9. – P. e003150. – doi: 10.1136/bmjopen-2013-003150.