

## К ВОПРОСУ О ПЕРСПЕКТИВАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ В ДИАГНОСТИКЕ ОСЛОЖНЕННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

С. В. ТАРАСЕНКО<sup>1</sup>, А. Ю. БОГОМОЛОВ<sup>1</sup>, А. А. НИКИФОРОВ<sup>1</sup>, О. В. ЗАЙЦЕВ<sup>1</sup>, А. А. НАТАЛЬСКИЙ<sup>1</sup>,  
С. Н. СОКОЛОВА<sup>1</sup>, Т. С. РАХМАЕВ<sup>1</sup>, В. П. КОЧУКОВ<sup>2</sup>, О. А. КАДЫКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань

<sup>2</sup>ФГБУ Объединенная больница с поликлиникой Управления делами  
Президента Российской Федерации, Москва

### Сведения об авторах:

**Тарасенко Сергей Васильевич** – д.м.н., профессор, зав. каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

**Богомолов Алексей Юрьевич** – очный аспирант каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: alexej.rzgm@gmail.com

**Никифоров Александр Алексеевич** – к.м.н., доцент, заведующий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

**Зайцев Олег Владимирович** – д.м.н., доцент каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань

**Натальский Александр Анатольевич** – д.м.н., доцент каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: lorey1983@mail.ru

**Соколова Светлана Николаевна** – к.м.н., доцент каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

**Рахмаев Тимур Саидович** – ассистент каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

**Кочуков В.П.** – д.м.н., заведующий хирургическим отделением ФГБУ Объединенная больница с поликлиникой управления делами президента РФ

**Кадыкова Оксана Александровна** – очный аспирант каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

В настоящее время возрастает заболеваемость хроническим панкреатитом. Целью исследования было изучение возможностей определения полиморфизмов генов в комплексной диагностике хронического панкреатита. В исследование были включены 63 пациента с верифицированным диагнозом «хронический панкреатит». В первую группу вошел 31 обследуемый с осложненными клиническими формами, во вторую группу - 32 пациента не страдающих осложненными формами. Всем пациентам из первой группы было выполнено хирургическое лечение хронического панкреатита: резекционные операции на поджелудочной железе. В рамках исследования проведен анализ полиморфизмов генов PRSS1 (мутация R122H) - ген катионного трипсиногена, CFTR1 (мутация del508) - ген муковисцидоза-1, CFTR2 (мутация Gly542Ter) – ген муковисцидоза-2, SPINK1 (мутация N34S) - ген панкреатического секреторного ингибитора трипсина, ген АДГ (ADH1B\*2). Анализировали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» при помощи системы «SNP-экспресс-РВ» ООО НТП «Литех» (г. Москва). В ходе исследования определена статистически достоверная корреляция между полиморфизмом гена АДГ и риском развития осложненных форм хронического панкреатита.

**Ключевые слова:** хронический панкреатит, полиморфизм генов, резекции поджелудочной железы.

За последние десятилетия отмечается рост и «омоложение» заболеваний хроническим панкреатитом (ХП). ХП является мультифакториальным заболеванием, в развитии которого играют роль как внешние факторы риска, так и внутренние, в т.ч. генетические особенности человека [1]. Любой морфогенетический процесс является результатом действия многих генов, так называемой генной сети, которая определяет синтез ферментов и структурных белков. Исследования полиморфизмов генов в настоящее время активно проводятся в различных направлениях клинической медицины [2].

Патоморфологической основой развития хронического панкреатита является выраженная структурная перестройка, склероз и фиброз, паренхимы поджелудочной железы, что приводит к нарушению оттока секрета железы, к увеличению поджелудочной железы в размерах и, нередко, сдавлению пара-

панкреатических структур [3]. ХП отличается разнообразием клинических форм [4].

К осложненным клиническим формам ХП относили: хронический абдоминальный болевой синдром, неподдающийся медикаментозной терапии, либо рецидивирующий сразу же после прекращения консервативной терапии;

сдавление холедоха с развитием синдрома механической желтухи;

сдавление воротной вены с развитием синдрома портальной гипертензии;

сдавление двенадцатиперстной кишки и развитие дуоденостаза [5].

Неосложненными клиническими формами называли такое течение ХП, при котором в период ремиссии больные не предъявляли жалоб, по результатам инструментальных и лаборатор-

ных методов исследования не было получено данных о сдавлении парапанкреатических структур.

В настоящее время все большее внимание получают исследования генетических предпосылок развития хронической патологии органов пищеварения [6].

**Целью** исследования было изучение полиморфизма следующих генов:

1) ген катионного трипсиногена PRSS1, мутация в котором приводит к устойчивости трипсиногена к аутолизу и обуславливает его более легкую аутоактивацию [7];

2) ген панкреатического секреторного ингибитора трипсина SPINK1, мутации в котором нарушают процесс инактивации трипсина в ткани поджелудочной железы [7];

3) ген муковисцидоза-1,2 CFTR-1,2 (ген трансмембранного регулятора муковисцидоза), мутации в генах муковисцидоза проявляются на клеточном уровне недостаточной гидратацией и защелачиванием первичного секрета железы и увеличением его вязкости [7];

4) ген алкогольдегидрогеназы, мутация которого ускоряет процесс трансформации этанола в ацетальдегид и способствует накоплению его в клетках у больных с ХП.

#### Материалы и методы

В исследование включили 63 больных, находившихся на стационарном лечении в Центре хирургии печени, поджелудочной железы и желчевыводящих путей г. Рязани. Все пациенты были обследованы, согласно стандартам обследования больных с ХП. Получено информированное согласие всех пациентов на участие в исследовании. Все пациенты были распределены на 2 группы сравнения. Первую группу составили 31 больной, 29 мужчин и 2 женщины, в возрасте  $44,8 \pm 3,29$  с осложненными клиническими формами хронического панкреатита. Таким больным было показано или уже выполнено хирургическое лечение ХП. Во вторую группу были включены 32 пациента, 26 мужчин и 6 женщин, в возрасте  $44,7 \pm 5,09$ , страдающие неосложненными клиническими формами ХП. Исследование проводилось проспективно.

Всем больным выполнялись стандартные общеклинические и биохимические анализы. Верификацию диагноза хронического панкреатита проводили с использованием общепринятых методов инструментальной диагностики: ультразвукового исследования (УЗИ), фиброгастроуденоскопии (ФГДС), прямых методов рентгеноконтрастного исследования желчевыводящих путей и протоковой системы поджелудочной железы, компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ)[8].

В первой группе пациентам были выполнены следующие хирургические вмешательства:

- 23 (74,2%) пациентам выполнена операция Фрея: доступ срединный, пересекается двенадцатиперстно-ободочная связка, отводится печеночный изгиб ободочной кишки. Доступ к поджелудочной железе осуществляется вскрытием желудочно-ободочной связки. Для полной экспозиции поджелудочной

железы при операции Фрея мобилизуется нижний край ее. Выделяются воротная и верхняя брыжеечная вены. Вирсунгов проток идентифицируется с помощью тонкоигольной пункции, иглу направляют косо и кзади в соответствии с предполагаемым направлением протока, нужно избегать перешейка поджелудочной железы при поиске главного панкреатического протока, чтобы минимизировать повреждение подлежащей верхней брыжеечной вены, аспирация чистой жидкости является показателем того, что проток обнаружен. Не вынимая иглы электрокоагулятором в дистальном и проксимальном направлениях продольно вскрывается главный панкреатический проток. Накладываются гемостатические швы на ткань железы параллельно краю двенадцатиперстной кишки и отступя от него 3-4 мм. Скальпелем и коагулятором вырезается центральная часть головки и крючковидного отростка с оставлением полоски ткани вдоль внутреннего края двенадцатиперстной кишки. При операции Фрея желателно сохранять переднюю панкреатодуоденальную аркаду, однако это не всегда возможно при выраженном фиброзе железы. Пересечение гастродуоденальной артерии или передней аркады, образованной верхней и нижней панкреатодуоденальными артериями, не влияет на жизнеспособность двенадцатиперстной кишки. Не рекомендуется пересекать оба этих сосуда одновременно. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не повредить общий желчный проток, для чего он может быть интубирован металлическим проводником. Ободок ткани поджелудочной железы, содержащий ветви верхних и нижних панкреатодуоденальных артерий, сохраняется вдоль внутреннего края двенадцатиперстной кишки, справа от воротной вены сохраняется ободок ткани поджелудочной железы шириной 4-5 мм во избежание ранения сосудов и пересечения перешейка. После резекции головки остается короткий (1 см длиной) проксимальный отрезок главного панкреатического протока, который должен быть ревизован для удаления возможных конкрементов, а зонд должен свободно проходить в двенадцатиперстную кишку. Освобождается от фиброза и сдавления псевдокистами передняя поверхность интрапанкреатической части холедоха посредством иссечения рубцово измененной железы. Далее при операции Фрея формируется одно- или двухрядный продольный панкреатоеюноанастомоз с протоком и резецированной головкой на петле тонкой кишки, выделенной по Ру.

- 8 (25,8%) пациентам выполнялась операция Бегера: доступ срединный, пересекается двенадцатиперстно-ободочная связка, печеночный изгиб ободочной кишки отводится каудально. Осуществляется широкий маневр Кохера. Доступ к поджелудочной осуществляется путем вскрытия желудочно-ободочной связки. Затем следует обнажение верхней брыжеечной вены у нижнего края поджелудочной. Накладываются 2-4 шва-держалки на верхний и нижний края тела железы вблизи линии резекции. Швы позволяют приподнять тело железы при отделении от воротной вены и избежать кровотечения после пересечения железы. Затем диссекция ведется между передней поверхностью воротной вены и задней поверхностью головки

поджелудочной железы, либо сверху перешейка железы, начиная от воротной вены, либо, чаще, снизу перешейка от воротной вены. После пересечения железы перешеек приподнимается и отделяется от верхней брыжеечной и воротной вен. На левом срезе поджелудочной железы необходим тщательный гемостаз с помощью нерассасывающихся монофиламентных швов. Накладываются гемостатические швы по периферии головки. Паренхима железы рассекается вдоль левой боковой стенки интрапанкреатической части холедоха в направлении большого дуоденального сосочка. После резекции головка похожа на раковину со стенкой 5-8 мм толщиной, расположенную между холедохом и стенкой ДПК. Реконструктивный этап операции Бегера выполняется петлей тонкой кишки, выделенной по Ру, которая используется для панкреатикоюноанастомоза «конец в бок» с телом поджелудочной железы и «бок в бок» с оставшейся частью головки. Панкреатикоэнтеростомия может выполняться одно- или двухрядным непрерывным швом нерассасывающейся монофиламентной нитью. При наличии стеноза интрапанкреатической части холедоха, который невозможно устранить декомпрессией и резекцией окружающей панкреатической ткани, или случайном вскрытии интрапанкреатической порции общего желчного протока стенка желчного протока фиксируется отдельными швами к тканям по типу «открытой двери» и включается в проксимальный панкреатоеюноанастомоз.

Аналізу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» при помощи системы «SNP-экспресс-РВ» ООО НТП «Литех» (г. Москва). С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяли дать три типа заключений: нормальная гомозигота; гетерозигота; мутантная гомозигота.

Статистическую обработку выполняли при помощи пакета Microsoft Excel 7.0. При сравнении частот аллелей использовали критерий Фишера и  $\chi^2$ . Для оценки ассоциации изучаемых полиморфных вариантов генов с риском развития осложненных форм ХП рассчитывали отношение шансов OR (Odds Ratio).  $OR = (a \times d) / (b \times c)$ , где  $a$  – частота аллеля (генотипа) в выборке больных,  $b$  – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке,  $c$  – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных,  $d$  – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. OR определены с 95% и 99% доверительным интервалом (CI). OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR>1 – как положительную ассоциацию («повышенный риск развития патологии»), OR<1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием («пониженный риск развития патологии»).

#### Результаты и их обсуждение

Распределение генотипов в исследуемых группах оказалось следующим: нормальная гомозигота гена SPINK1 (AA) в первой группе определен у 29 (93,5%) больных, во второй – 31

(96,9%); гетерозигота AG встречалась соответственно у 2 (6,5%) и 1 (3,1%) больных.

Гомозиготный вариант CGC гена PRSS1 был определен у большинства: 27 (87,1%) больных в первой группе, у всех 32 (100%) – во второй группе. Гетерозиготный вариант CAT выделен в 4 случаях 4 (12,9%) у первой группы и не определен во второй группе (0%).

Изучение полиморфизма CFTR1 (мутация del508) выявило присутствие гомозигот в первой группе у 29 (93,5%) пациентов, во второй – 31 (96,9%). Гетерозиготный вариант встречался в 2 (6,5%), 2 (6,5%) случаях соответственно.

Полиморфизм CFTR2 (мутация Gly542Ter) не был выявлен ни у одного больного.

Полиморфизм гена АДГ ADH1B\*1/ADH1B\*2 гомозиготный вариант встретился в 1 группе в 20 (64,5%) случаев, во второй 30 (93,7%), гетерозиготы составили 11 (35,5%) и 2 (6,3%) соответственно. Число гетерозигот для гена АДГ оказалось наибольшим. Следует отметить, что по данным ранее проводимых исследований [9] в русских популяциях частота гетерозигот составляет 5,9%.

Патологические гомозиготы не были выявлены ни в одной группе. В табл. 1 обозначено число гомо- и гетерозигот и статистические расчеты.

У одного из пациентов отмечалось наличие полиморфизма генов и АДГ и PRSS1. Наибольшее значение отношения шансов в исследуемых группах превышает единицу более чем в 8 раз, это свидетельствует о том, что носительство гетерозиготы в гене АДГ является фактором риска развития осложненных форм ХП.

#### Выводы

1. Достоверных различий частоты встречаемости мутаций генов CFTR, SPINK1, PRSS1 в группах сравнения не определено.
2. У больных с осложненным течением хронического панкреатита достоверно чаще встречается мутация гена АДГ.
3. Вероятнее всего полиморфизм гена АДГ является одним из факторов, предрасполагающих к осложненному течению хронического панкреатита.
4. Определение полиморфизма гена АДГ может использоваться в комплексной диагностике и прогнозировании характера течения хронического панкреатита.
5. Внедрение исследований полиморфизмов генов в хирургическую практику позволит оптимизировать диагностику и прогнозирование характера течения хронического панкреатита.

#### Список литературы

1. Васильев Ю.В. Этиопатогенетические и клинические аспекты хронического алкогольного панкреатита // Гепатология. 2006. №3. С.19-24.
2. Исаева Т.Н., Севостьянова К.С., Серяпина Ю.В., Шевела А.И., Морозов В.В. Ассоциации изменений гемостаза после эндовенозной лазерной коагуляции с генетическими полиморфизмами // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2014. №3. С. 72-82.
3. Григорьева И.Н. Острый и хронический панкреатит. Новосибирск, 2010.

Таблица 1

**Распределение аллей у больных с хроническим панкреатитом**

Полиморфизм	Группа 1, N	Группа 2, N	F-критерий, P	Критерий $\chi^2$ , P	OR, P
Полиморфизм PRSS1 (мутация R122H)					
гетерозигота	4 (12,9%)	0 (0%)	-	4,409b p<0,05	-
гомозигота	27(87,1%)	32 (100%)			
Полиморфизм CFTR1 (мутация del508)					
гетерозигота	2 (6,5%)	1 (3,1%)	0,672 P > 0,05	0,384 p>0,05	2,138 (0,184 до 24,858) CI 95%
гомозигота	29 (93,5%)	31 (96,9%)			
Полиморфизм CFTR2 (мутация Gly542Ter)					
гетерозигота	0 (0%)	0(0%)	-	-	-
гомозигота	31 (100%)	32 (100%)			
Полиморфизм SPINK1 (мутация N34S)					
гетерозигота	2 (6,5%)	1 (3,1%)	0,672 P > 0,05	0,384 p>0,05	2,138 (0,184 до 24,858) CI 95%
гомозигота	29(93,5%)	31(96,9%)			
Полиморфизм гена АДГ АДН1В*2					
гетерозигота	11 (35,5%)	2 (6,3%)	3,055 P < 0,01	8,217 P < 0,01	8,250 (1,650 до 41,248) CI 95%
гомозигота	20 (64,5%)	30 (93,7%)			

4. Тарасенко С.В., Песков О.Д., Милов Д.И., Артамонов С.В. Клинические формы деструктивного панкреатита // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2001. №3-4. С. 40-42

5. Калинин А.В. Хронический панкреатит: распространенность, этиология, патогенез, классификация и клиническая характеристика этиологических форм (Сообщ. 1) // Клинические перспективы гастроэнтерологической гепатологии. 2006. №6. С. 5-15.

6. Марусин А.В., Степанов В.А., Спиридонова М.Г., Пузырев В.П. Полиморфизм генов алкогольдегидрогеназ АДН1В и АДН7 в русский популяциях Сибирского региона // Молекулярная биология. 2004. Т.38, №4. С. 625-631.

7. Gasiorowska A., Talar-Wojnarowska R., Smolarz B. The prevalence of pancreatic serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK 1) and cationic trypsinogen gene (PRSS1) mutations in polish patients with chronic alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer // Pancreatology. 2006. №6. С.393-394.

8. Омельянович Д.А., Благовестнов Д.А., Андреев В.Г., Алмакаев Ф.Р. Качество жизни и отдаленные результаты лечения тяжелого острого панкреатита // Хирургическая практика. 2015. №1. С. 4-10

9. Натальский А.А., Тарасенко С.В., Зайцев О.В., Песков О.Д. Современные представления о печеночной недостаточности в хирургии // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. №4. С. 138-147.

## POSSIBILITIES DETERMINATION OF POLYMORPHISMS OF GENES IN THE DIAGNOSIS OF COMPLICATED CLINICAL FORMS OF CHRONIC PANCREATITIS

S. V. TARASENKO<sup>1</sup>, A. YU. BOGOMOLOV<sup>1</sup>, A. A. NIKIFOROV<sup>1</sup>, O. V. ZAITSEV<sup>1</sup>, A. A. NATALSKII<sup>1</sup>,  
S. N. SOKOLOVA<sup>1</sup>, T. S. RAKHMAEV<sup>1</sup>, V. P. KOCHUKOV<sup>2</sup>, O. A. KADYKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan*

<sup>2</sup>*FGBU «Combined hospital with policlinics» Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow*

### Information about the authors:

**Tarasenko S.V.** – MD, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

**Bogomolov A.Yu.** – Intramural post-graduate student of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, e-mail: alexej.rzgmu@gmail.com

**Nikiforov A.A.** – MD, PhD, Head of the Central Research Laboratory Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

**Zaitsev O.V.** – MD, Associate Professor of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

**Natal'skii A.A.** – MD, Dept. Assistant of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, e-mail: lorey1983@mail.ru

**Sokolova S.N.** – MD, PhD, Department of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

**Rachmaev T.S.** – Assistant of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

**Kochukov V.P.** - Ph. D., Chief Consultant in Surgery-Management Office of the President of the Russian Federation Director of Surgery- Management Office of the President of the Russian Federation. Federal State Institution «United Hospital and Policlinic»

**Kadykova O.A.** – Intramural post-graduate student of Department of Hospital Surgery Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

At present, it increases the incidence of chronic pancreatitis. The aim of the study was to investigate the possibilities of determining polymorphisms of genes in the complex diagnosis of chronic pancreatitis. In the study 63 patients with verified diagnosis of "chronic pancreatitis" are included. The first group included 31 examinees with complicated clinical forms, the second group - 32 patients not suffering from complicated forms. All patients in the first group of chronic pancreatitis surgical treatment was performed. The study analyzed the polymorphisms PRSS1 gene (R122H mutation) - a gene cationic trypsinogen, CFTR1 (mutation del508) - cystic fibrosis-1 gene, CFTR2 (Gly542Ter mutation) - cystic fibrosis-2 gene, SPINK1 (N34S mutation) - a gene pancreatic secretory trypsin inhibitor, ADH gene (ADH1B \* 2). Analysis was human genomic DNA isolated from whole blood leukocytes using the reagent "DNA rapid blood" with "the SNP-Express-PB" OOO NTP system "Liteh" (Moscow). The study identified a statistically significant correlation between ADH gene polymorphism and the risk of complicated forms of chronic pancreatitis.

**Key words:** chronic pancreatitis, gene polymorphism, pancreatic resection.