

Поліморфізм генів прозапальних та протизапальних цитокінів у хворих із гострим панкреатитом у північно-східному регіоні України

І. Д. Дужий, О. Л. Ситнік, В. Я. Пак
Сумський державний університет

Polymorphism of the proinflammatory and anti-inflammatory cytokines genes in patients with an acute pancreatitis in the Northern-Eastern region of Ukraine

I. D. Duzhyi, O. L. Sytnik, V. Ya. Pak
Sumy State University

Реферат

Мета. Визначити вплив поліморфізму генів прозапального – інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) та протизапального – інтерлейкіну–10 С–592А (rs 1800872) цитокінів на перебіг гострого панкреатиту.

Матеріали і методи. Методом полімеразної ланцюгової реакції вивчено поліморфізм генів прозапального – інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) і протизапального – інтерлейкіну–10 С–592А (rs 1800872) цитокінів у 83 хворих із гострим панкреатитом. Контрольну групу склали 60 здорових осіб без гострого панкреатиту в анамнезі.

Результати. Визначено частоту поліморфізму генів інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) та інтерлейкіну–10 С–592А (rs 1800872) при набряковій і деструктивній формах гострого панкреатиту, а також у оперованих пацієнтів.

Висновки. Перехід гострого панкреатиту в некротичну форму не був пов'язаний із видом поліморфізму генів прозапального – інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) та протизапального – інтерлейкіну–10 С–592А (rs 1800872) цитокінів. У носіїв генотипу Т/Т гена інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) статистично значущо частіше виконували оперативні втручання з приводу ускладнень гострого панкреатиту. Поліморфізм А/Т гена інтерлейкіну–8 А–251Т (rs 4073) та, можливо, поліморфізм А/А гена інтерлейкіну–10 С–592А (rs 1800872) асоціювалися із сприятливим, неускладненим перебігом гострого панкреатиту.

Ключові слова: гострий панкреатит; поліморфізм генів прозапальних і протизапальних цитокінів; ускладнення; оперативне лікування.

Abstract

Objective. To determine the influence of the genes polymorphism of proinflammatory – interleukin–8 А–251Т (rs 4073) and antiinflammatory – interleukin–10 С–592А (rs 1800872) cytokines on course of an acute pancreatitis.

Materials and methods. The genes polymorphism of proinflammatory – interleukin–8 А–251Т (rs 4073) and antiinflammatory – interleukin–10 С–592А (rs 1800872) cytokines were studied in 83 patients with an acute pancreatitis, using the method of polymerase chain reaction (PCR). The control group have consisted of 60 healthy persons without an acute pancreatitis in anamnesis.

Results. The rate of the genes polymorphism of interleukin–8 А–251Т (rs 4073) and interleukin–10 С–592А (rs 1800872) was determined in oedematous and destructive forms of an acute pancreatitis, as well as in patients operated on.

Conclusion. The acute pancreatitis transition into necrotic form was not connected with the kind of the genes polymorphism of proinflammatory – interleukin–8 А–251Т (rs 4073) and antiinflammatory – interleukin–10 С–592А (rs 1800872) cytokines. Operative interventions for an acute pancreatitis complications were performed statistically significantly more frequently in carriers of the Т/Т gene genotype of interleukin–8 А–251Т (rs 4073). The favorable, noncomplicated course of an acute pancreatitis was associated with polymorphism of the А/Т gene interleukin–8 А–251Т (rs 4073) and, possibly, – with polymorphism of the А/А gene interleukin–10 С–592А (rs 1800872).

Keywords: acute pancreatitis; the genes polymorphism of proinflammatory and antiinflammatory cytokines; complications; operative treatment.

Гострий панкреатит (ГП) є одним із найбільш частих гострих хірургічних захворювань органів черевної порожнини. В Україні захворюваність на ГП становить 5,2 – 6,9 на 10 тисяч населення. Летальність, незважаючи на впровадження сучасних протоколів консервативного лікування та застосування методів мініінвазивних хірургічних втручань, лишається на рівні 7 – 15%, а при некротичній формі ГП сягає 40 – 70% [1].

На даний час уже визначені основні механізми пошкодження підшлункової залози (ПЗ) та встановлені патогенетичні фактори прогресування захворювання. Одною з провідних ланок розвитку ГП є «відхилення» ферментів у кров, паренхіму ПЗ і парапанкреатичну клітковину, що призводить до виникнення вогнищ некрозу, які контамінує патогенна мікрофлора. Синдром поліорганної недостатності (СПОН) є тяжким ускладненням і основною

причиною летальності при ГП [2, 3]. Універсальною системою регуляції, яка проявляє себе як при міжклітинному контакті, так і дистанційно, є цитокіни. Прозапальні цитокіни активують захисну функцію тканин навколо себе, спрямовують з циркуляторного русла до вогнища запалення лейкоцити та лімфоцити. Синтезуючись у вогнищі запалення, цитокіни чинять системний вплив на всі клітини й органи, які беруть участь у запальній відповіді. Надлишкова продукція прозапальних цитокінів сама стає чинником поширення патологічного процесу. Одним із факторів розвитку і прогресування СПОН при ГП є прозапальний цитокін інтерлейкін-8 (ІЛ-8). Він сприяє вивільненню з нейтрофільних лейкоцитів біологічно активних речовин (активні метаболіти кисню, еластаза, метаболіти арахідонової кислоти, мієлопероксидаза тощо) з наступними нейтрофільною інфільтрацією тканини ПЗ та її пошкодженням [4]. Навіть після клінічного одужання пацієнта з тяжким ГП ці пошкодження спричиняють довготривалі порушення екзо- і ендокринної функцій ПЗ [5]. Відомо, що у хворих із ГП після виконаного оперативного втручання рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові зростає, що негативно впливає на перебіг захворювання [6]. Синдром компенсаторної протизапальної відповіді реалізується за допомогою різноманітних чинників, зокрема цитокіну інтерлейкіну-10 (ІЛ-10), який виявляють у сироватці крові вже з початку захворювання [7]. Від дотримання балансу між прозапальними і протизапальними цитокінами в певній мірі залежить розвиток ГП та безпосередній результат лікування хворих.

Дослідження нейтрофільних лейкоцитів та асоційованих із ними біологічно активних речовин у патогенезі ГП довело, що пригнічення активності нейтрофільної еластази (НЕ) може бути багатонадійною стратегією щодо запобігання тяжкому перебігу захворювання. Аналіз зразків сироватки крові хворих із ГП у клініці показав, що активність НЕ була пов'язана з прогнозованою тяжкістю ГП та розвитком дихальної недостатності. Вивільнення НЕ на початку патологічного процесу в паренхімі ПЗ викликає набряк та пошкодження клітин органа. Ключовим білком, що опосередковує клітинний контакт, є Е-кадгерин. НЕ розщеплює Е-кадгерин, викликаючи дисоціацію клітинних контактів, що потім посилює транслокацію лейкоцитів у паренхімі ПЗ. НЕ не лише бере участь у пошкодженні тканини ПЗ, а й посилює системну запальну відповідь, спричиняючи тяжкий перебіг ГП. Нейтрофіли з підвищеною активністю еластази також посилювали набряк і пошкодження легень. Інгібування НЕ *in vivo* значно зменшувало транслокацію лейкоцитів і знижувало тяжкість захворювання [8, 9].

Мета дослідження: вивчити вплив поліморфізму генів прозапального – ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) і протизапального – ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) цитокінів на перебіг ГП.

Матеріали і методи дослідження

Основна група була сформована із 83 пацієнтів із ГП у першому періоді захворювання (до 14 діб з моменту його

початку), які представляли європеїдне населення північно-східного регіону України. Пацієнти перебували на стаціонарному лікуванні в хірургічних відділеннях. Чоловіків було 51 (61,4%), жінок – 32 (38,6%), середній вік пацієнтів становив 53,3 року. Контрольну групу склали здорові донори-європеїди без ГП в анамнезі.

Показаннями до оперативного лікування вважали: клінічну картину панкреатогенного перитоніту з наявністю в черевній порожнині більше 500 мл рідини; формування обмежених рідинних утворень в черевній порожнині та/або заочеревинному просторі з наявністю осередків деструкції тканин та симптомами інфікування; поліорганну недостатність, що прогресувала. Ультразвукове дослідження, за допомогою якого верифікували рідинні утворення та осередки деструкції, виконували на сканері HS – 2000 (Honda Electronics, Японія).

Аналіз поліморфних варіантів цитокінів проводили на базі лабораторії молекулярно-генетичних досліджень університету. Вивчали зразки ДНК з лейкоцитів периферичної крові. Застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням термоциклера GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США). Продукти рестрикції розділяли горизонтальним електрофорезом (0,13А; 200V) 40 хв (ІЛ-8) або 25 хв (ІЛ-10) з подальшою візуалізацією ДНК з використанням транслюмінатора «Біоком».

Етичні принципи, відображені в Конституції України та Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації, були основними в роботі з пацієнтами. Всі діагностичні дослідження проводили тільки після повного роз'яснення пацієнтам про їх мету та отримання від них письмової згоди.

Для оцінки статистичної значущості відмінностей між групами використовували непараметричні методи статистичного аналізу: критерій Пірсона (χ^2) і точний двосторонній критерій Фішера.

Результати

Частота поліморфізму гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) у хворих із різними формами ГП (83) та у здорових осіб (60) статистично значущо не відрізнялася (табл. 1).

Також досліджено (табл. 2) поліморфізм гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) у хворих із деструктивною формою ГП (25), у яких виникли показання до виконання оперативних втручань (11) і у яких показань до виконання оперативних втручань не було (14).

Поміж хворих із деструктивною формою ГП, яким за встановленими показаннями було проведено оперативне лікування, у 63,6% спостерігали статистично значущо ($p < 0,05$) підвищену частоту виявлення носіїв генотипу Т/Т. Частота виявлення носіїв генотипу Т/Т серед хворих із деструктивною формою ГП, у яких не виявлено показань до оперативного лікування, становила 7,1%. Серед пацієнтів із деструктивною формою ГП, що потребували хірургічного лікування, спостерігали статистично значущо ($p < 0,05$) нижчу частоту виявлення носіїв геноти-

Таблиця 1. Розподіл носіїв генотипів за поліморфізмом гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) серед хворих з різними формами ГП та здорових осіб

Вид поліморфізму	Здорові особи (n=60)		Форми ГП			
			набрякова (n=58)		деструктивна (n=25)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T/T	22	36,7	22	37,9	8	32,0
A/T	27	45,0	25	43,1	15	60,0
A/A	11	18,3	11	19,0	2	8,0

Таблиця 2. Розподіл носіїв генотипів за поліморфізмом гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) серед оперованих і неоперованих хворих із деструктивною формою ГП та здорових осіб

Вид поліморфізму	Здорові особи (n=60)		Хворі із деструктивною формою ГП			
			неоперовані (n=14)		оперовані (n=11)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T/T	22	36,6	1	7,1*	7	63,6*
A/T	27	45,0	11	78,6*	4	36,4*
A/A	11	18,4	2	14,3	0	0

Примітка. * – статистична значущість відмінностей (p < 0,05).

Таблиця 3. Розподіл носіїв генотипів за поліморфізмом гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) серед хворих із різними формами ГП та здорових осіб

Вид поліморфізму	Здорові особи (n=100)		Форми ГП			
			набрякова (n=58)		деструктивна (n=25)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
C/C	64	64,0	41	70,7	13	52,0
C/A	33	33,0	15	25,8	12	48,0
A/A	3	3,0	2	3,5	0	0

Таблиця 4. Розподіл носіїв генотипів за поліморфізмом гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) серед оперованих і неоперованих хворих із деструктивною формою ГП та здорових осіб

Вид поліморфізму	Здорові особи (n=100)		Хворі з деструктивною формою ГП			
			неоперовані (n=14)		оперовані (n=11)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
C/C	64	64,0	6	42,9	7	63,6
C/A	33	33,0	8	57,1	4	36,4
A/A	3	3,0	0	0	0	0

пу А/Т (36,4%), ніж серед хворих із деструктивною формою ГП, у яких не було показань до оперативного лікування (78,6%). Серед хворих із деструктивною формою ГП, що не потребували хірургічного лікування, носії генотипу А/А траплялися рідко, а серед хворих із деструктивною формою ГП, що потребували хірургічного лікування, носії генотипу А/А не було.

Досліджено поліморфізм гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) у хворих із різними формами ГП (табл. 3).

При вивченні отриманих алельних варіантів гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) встановлено, що в контрольній групі переважали особи (64,0%) з гомозиготами за ос-

новним алелем (генотип С/С). Поміж хворих із деструктивною формою ГП спостерігали статистично незначущо (p > 0,05) підвищену (48%) частоту виявлення носіїв генотипу С/А.

Вивчено результати дослідження (табл. 4) поліморфізму гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) у хворих із деструктивною формою ГП (25), у яких виникли показання до виконання оперативних втручань (11) і у неоперованих 14 пацієнтів.

Серед пацієнтів із деструктивною формою ГП, що потребували хірургічного лікування, у 63,6% спостерігали статистично незначущо (p > 0,05) підвищену частоту ви-

явлення носіїв генотипу С/С. Серед пацієнтів із деструктивною формою ГП, у яких не було показань до виконання оперативних втручань, у 57,1% спостерігали статистично незначущо ($p > 0,05$) підвищену частоту виявлення носіїв генотипу С/А. Поміж пацієнтів із деструктивною формою ГП носіїв генотипу А/А не реєстрували.

Обговорення

Розподіл носіїв генотипів за поліморфізмом генів прозапального цитокіну ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) та протизапального цитокіну ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) серед хворих із різними формами ГП та в контрольній групі статистично значущо не відрізнявся.

Статистично значущо підвищена частота виявлення носіїв генотипу Т/Т прозапального цитокіну ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) поміж хворих із деструктивною формою ГП, у яких виникли показання до виконання оперативного втручання, у порівнянні з відповідним показником поміж неоперованих хворих вказує на зв'язок генотипу Т/Т з несприятливим перебігом ГП та виникненням показань до проведення оперативного лікування. Статистично значущо менша частота виявлення носіїв генотипу А/Т прозапального цитокіну ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) серед пацієнтів із деструктивною формою ГП, у яких виникли показання до виконання оперативного втручання, в порівнянні з частотою виявлення таких носіїв серед хворих із деструктивною формою ГП без показань до проведення оперативного лікування свідчить про зв'язок генотипу А/Т та сприятливого перебігу захворювання. Той факт, що серед хворих із деструктивною формою ГП рідко реєстрували носіїв генотипу А/А прозапального цитокіну ІЛ-8 А-251Т (rs 4073), ймовірно, пов'язаний із регіональними особливостями цього генотипу та вказує на можливий захисний вплив даного алельного варіанта щодо ускладненого перебігу ГП.

Алельні варіанти С/А та А/А гена протизапального цитокіну ІЛ-10 С-592А (rs 1800872), можливо, мають захисний вплив щодо виникнення ускладнень ГП.

Висновки

1. Перехід ГП в некротичну форму не був пов'язаний із видом поліморфізму генів прозапального – ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) та протизапального – ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) цитокінів.

2. У носіїв генотипу Т/Т гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) статистично значущо частіше виконували оперативні втручання з приводу ускладнень ГП.

3. Поліморфізм А/Т гена ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) і, можливо, поліморфізм С/А та А/А гена ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) асоціювалися зі сприятливим, неускладненим перебігом ГП.

Перспективи досліджень. Визначення кореляції поліморфізму генів прозапального – ІЛ-8 А-251Т (rs 4073) та протизапального – ІЛ-10 С-592А (rs 1800872) цитокі-

нів та активності НЕ в сироватці хворих із ГП, на нашу думку, є перспективним напрямком подальших досліджень.

Фінансування. Роботу виконано за кошти державного бюджету.

Внесок авторів. Дужий І. Д. – концепція, дизайн дослідження, редагування; Ситнік О. Л. – збір матеріалу, написання і редагування тексту, аналіз отриманих даних; Пак В. Я. – збір і опрацювання матеріалу.

Конфлікт інтересів. Автори, які взяли участь в цьому дослідженні, заявили, що у них немає конфлікту інтересів щодо цього рукопису.

Згода на публікацію. Всі автори прочитали і схвалили остаточний варіант рукопису. Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

References

- Petrushenko VV, Stolyarchuk OV, Pankiv KM, Bilyk OM. Possibilities of antioxidant therapy, directed on restriction of the organs disorders in early phase of an acute necrotic pancreatitis. *Klin khir.* 2017 Oct 24;(10): 14–6. Ukrainian. doi:10.26779/2522–1396.2017.10.14.
- Garg PK, Singh VP. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2019 May;156(7):2008–23. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.041. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30768987; PMCID: PMC6486861.
- Gliem N, Ammer–Herrmenau C, Ellenrieder V, Neesse A. Management of Severe Acute Pancreatitis: An Update. *Digestion.* 2021;102(4):503–7. doi: 10.1159/000506830. Epub 2020 May 18. PMID: 32422634; PMCID: PMC8315686.
- Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, et al. The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur J Immunol.* 1990 Sep;20(9):2113–8. doi: 10.1002/eji.1830200933. PMID: 2145175.
- Pendharkar SA, Singh RG, Petrov MS. Pro-inflammatory cytokine-induced lipolysis after an episode of acute pancreatitis. *Arch Physiol Biochem.* 2018 Dec;124(5):401–9. doi: 10.1080/13813455.2017.1415359. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29235373.
- Perejaslov AA, Chuklin SM, Fedorov VI. Means of proinflammatory cytokines in the pathogenesis of multiple organ failure on acute pancreatitis. *Scientific Bulletin of Uzhhorod National University. Series: Medicina* 2000;(12):94–7. Ukrainian.
- Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. *Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. Crit Care Med.* 1999 Apr;27(4):749–55. doi: 10.1097/00003246–199904000–00029. PMID: 10321665.
- Wan J, Ren Y, Yang X, Li X, Xia L, Lu N. The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Acute Pancreatitis. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 21;8:565758. doi: 10.3389/fcell.2020.565758. PMID: 33553136; PMCID: PMC7859271.
- John DS, Aschenbach J, Krüger B, Sandler M, Weiss FU, Mayerle J, et al. Deficiency of cathepsin C ameliorates severity of acute pancreatitis by reduction of neutrophil elastase activation and cleavage of E-cadherin. *J Biol Chem.* 2019 Jan 11;294(2):697–707. doi: 10.1074/jbc.RA118.004376. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30455353; PMCID: PMC6333881.

Надійшла 09.10.2022