

UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

COLLEGIUM MEDICUM

Kierunek studiów: **Nauki o zdrowiu**

**Monika Wawszczak-Kasza**

**Nr albumu 106464**

**Ocena zmienności genu karboksypeptydazy u chorych**

**na ostre zapalenie trzustki**

**Analysis of carboxypeptidase gene variability in patients**

**with acute pancreatitis**

Rozprawa doktorska  
napisana pod kierunkiem  
**prof. dr hab. n med.**  
**Stanisława Głuszka**  
oraz promotora pomocniczego  
**dr hab. Wioletty Adamus-**  
**Bialek**

Praca przyjęta pod względem  
merytorycznym i formalnym w formie  
papierowej i elektronicznej

.....

/data i podpis promotora/

KIELCE 2022

*Pragnę złożyć najszczerze  
podziękowania promotorowi **prof. Stanisławowi  
Głuszkowi** za wkład w mój rozwój naukowy,  
poświęcony czas, cenne rady, a także za wsparcie,  
wrozumiałość i życzliwość.*

*Dziękuję **dr hab. Wioletcie Adamus-Białek** za  
opiekę naukową i motywację, które pozwoliły na  
powstanie niniejszej pracy.*

*Dziękuję wszystkim osobom, dzięki którym  
powstała ta praca, szczególne podziękowania  
składam mojemu mężowi i rodzicom.*

*Pracę dedykuję mojemu synowi Wojtkowi.*

## Spis treści

1.	Wstęp.....	7
1.1	Epidemiologia ostrego zapalenia trzustki .....	8
1.2	Etiologia ostrego zapalenia trzustki .....	9
1.2.1	Kamica żółciowa .....	9
1.2.2	Alkohol.....	10
1.2.3	Hipertriglicerydemia .....	11
1.2.4	Zabiegi endoskopowe.....	12
1.2.5	Inne rzadkie przyczyny OZT.....	12
1.3	Znaczenie mutacji genetycznych w zapaleniach trzustki.....	13
1.3.1	Mutacje genu <i>SPINK1</i> .....	13
1.3.2	Mutacje genu <i>CTRC</i> .....	14
1.3.3	Mutacje genu <i>CFTR</i> .....	14
1.3.4	Mutacje genu <i>PRSSI</i> i <i>PRSS2</i> .....	15
1.3.5	Mutacje genu <i>CPAI</i> .....	16
1.3.6	Mutacje <i>TRPV6</i> .....	16
1.4	Obraz kliniczny ostrego zapalenia trzustki .....	16
1.4.1	Stopnie ciężkości choroby i jej powikłania.....	17
1.4.2	Prognozowanie przebiegu OZT .....	18
1.5	Ostre nawracające zapalenie trzustki i przewlekłe zapalenie trzustki.....	18
1.6	Mechanizm powstawania zapalenia .....	19
1.7	Stres siateczki śródplazmatycznej i jego rola w ostrym zapaleniu trzustki ...	21
1.8	Enzymy trzustkowe synteza i transport.....	23
1.9	Enzymy proteolityczne trzustki.....	25
1.10	Karboksypeptydaza .....	26
1.11	Uzasadnienie wyboru tematu badawczego .....	30
2.	Cele pracy .....	31

3.	Materiały i metody .....	32
3.1	Przechowywanie materiału biologicznego .....	33
3.2	Izolacja materiału genetycznego .....	33
3.3	Kontrola jakości materiału .....	34
3.4	Amplifikacja fragmentów DNA .....	34
3.5	Sekwencjonowanie .....	36
3.6	Analiza jakościowa chromatogramów .....	36
3.7	Analiza sekwencji .....	37
3.8	Analiza statystyczna .....	37
4.	Wyniki .....	38
4.1	Ogólna charakterystyka badanej grupy .....	38
4.1.1	Etiologia zapalenia .....	38
4.1.2	Nawrotowość .....	40
4.1.3	Obciążenie wywiadem rodzinnym .....	40
4.1.4	Przebieg zapalenia .....	41
4.2	Analiza ogólna mutacji zidentyfikowanych w badanym materiale .....	41
4.3	Analiza częstości występowania mutacji w poszczególnych grupach .....	42
4.4	Podział ze względu na etiologię zapalenia .....	48
4.4.1	Nawrotowość zapalenia .....	51
4.4.2	Mutacje a przebieg zapalenia .....	51
4.5	Współwystępowanie mutacji .....	53
4.6	Mutacje genetyczne a powikłania miejscowe .....	54
4.7	Mutacje genetyczne w kontekście obciążenia wywiadem rodzinnym .....	55
4.8	Podsumowanie wyników badań .....	56
5.	Dyskusja .....	57
6.	Wnioski .....	68
7.	Piśmiennictwo .....	69

Streszczenie.....	84
Abstract .....	86
Spis rycin.....	88
Spis tabel.....	89

## Wykaz zastosowanych skrótów

**ATF** – (ang. *activating transcription factor*) czynnik aktywujący transkrypcję

**BiP** – (ang. *Binding immunoglobulin protein*)

**bZIP** – (ang. *Basic Leucine Zipper Domain*) jednostka podstawowa suwaka leucynowego

**CASR** – (ang. *calcium sensing receptor*) receptor stężenia wapnia

**CFTR** – (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) błonowy regulator przewodnictwa

**CHOP** – (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein homologous*)

**CPA1, A2, B** – (ang. *carboxypeptidase A1, A2, B*) karboksypeptydaza A1, A2, B

**CREB/ATF** - (ang. *cAMP response element binding protein / Activating transcription factors*)

**CRL** - długość ciągłego odczytu (ang. *contiguous read length*).

**CTRC** – (ang. *chymotrypsin C*) chymotrypsyna C

**CYP2E1** – (ang. *Cytochrome P450 2E1*) cytochrom P450 2E1

**del** – delecja

**eIF2 alfa, beta** - (ang. *Eukaryotic Initiation Factor 2 alfa, beta*)

**ER** – (ang. *endoplasmic reticulum*) retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna

**ERAD** – (ang. *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) degradacja białek związana z ER

**ERCP** (ang. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*)

Endoskopowa

Cholangiopankreatografia Wsteczna

**ERS** – (ang. *endoplasmic reticulum stress*) stres siateczki śródplazmatycznej

**fs** – (ang. *frame shift variant*) mutacje zmieniające ramkę odczytu

**IRE1 $\alpha$**  – (ang. *inositol-requiring kinase 1 $\alpha$* ) kinaza inozytolo-zależna

**NF- $\kappa$ B** – (ang. *nuclear factor kappa- $\beta$* ) jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa- $\beta$

**OZT** – ostre zapalenie trzustki

**PERK** - (ang. *pancreatic ER eIF2 $\alpha$  kinase*) – kinaza trzustkowa związana z ERS

**PRSSI** – (ang. *serine protease 1*) trypsynogen kationowy

**PRSS2** – (ang. *serine protease 2*) trypsynogen anionowy

**pz** – pary zasad

**PZT** – przewlekłe zapalenie trzustki

**RIDD** – (ang. *redulates IRE1-dependent Decay*) degradacja zależna od IRE1

**RIG-1** (ang. *retionic-acid-inducible gene-1*) gen indukowany kwasem retinowym

**ROS** – (ang. *reactive oxigen species*) reaktywne formy tlenu

**SPINK1** – (ang. *Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 1*) – inhibitor wydzielania trypsyny

**TRAF2** – (ang. *TNF $\alpha$  receptor-associated factor 2*) czynnik związany z receptorem TNF $\alpha$

**TRPV6** – (ang. *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6*) białko błonowe kanału wapniowego

**UI** – (ang. *uncertainty interval*) przedział niepewności

**UPR** – (ang. *Unfolded protein responce*) odpowiedź na wystąpienie źle sfałdowanego białka

**VLDL** – (ang. *very-low-density-lipoproteins*) lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

**XBP1** – (ang. *X-box-binding protein-1*)

## 1. Wstęp

Pierwszy w historii opis objawów i zmian anatomicznych trzustki przypisywanych ostremu zapaleniu trzustki (OZT) został opublikowany w Bazylei w 1579 r. przez lekarza Iacobo Auberto Vindone (1500–1587), który przeprowadził sekcję zwłok u alkoholika z martwiczymi zmianami trzustki. Kolejny kliniczny opis objawów i zmian wskazujących na pacjenta z OZT został opublikowany w 1625 roku przez holenderskiego lekarza Nicolasa Tulpa (1593-1674) [1]. Tulp w swojej czwartej książce „*Observationes medicae*” opisał przypadek młodego mężczyzny, który tuż przed śmiercią cierpiał na ból pleców, obniżoną temperaturę ciała, bezsenność oraz pobudzenie. Dodatkowo zmiany anatomiczne zaobserwowane po śmierci mężczyzny ujawniły wystąpienie ropnia trzustki [1,2]. W kolejnej dekadzie podobnych obserwacji dokonał francuski lekarz Guy Patit (1601-1672). W 1679 roku Theophile Bonet (1620-1689) opisał zmiany morfologiczne i ropne w trzustce. Dwa lata później J. G. Greisel w swojej książce „*De repentina suave morte ex pancreate sphacelato*” opublikował nowy opis martwicy trzustki. Przez kolejne lata lekarze tacy jak Giovanni Battista Morgagni, Thomas Cawley, opisywali kolejne przypadki chorób trzustki, których opisy mogłyby wskazywać na ostre zapalenie trzustki. W 1793 roku Matthew Baillie (1761-1823) opisał chorego

o cechach „*twardej trzustki z podkreśloną budową zrazikową, złogami w przewodzie oraz obszarami zwłóknień*”, które mogłyby wskazywać na przewlekłe zapalenie trzustki. Reginald Fitz zaprezentował pracę "*Acute Pancreatitis: A Consideration of Hemorrhagic, Suppurative, and Gangrenous Pancreatitis and of Disseminated Fat Necrosis*", w której to w systematyczny sposób przeanalizował obraz kliniczny 53 chorych z ostrym zapaleniem trzustki [3]. Od tego czasu opisywano dwa różne anatomiczne aspekty zmian trzustki, interpretowane jako ostre zapalenie trzustki i przewlekłe zapalenie trzustki co zaowocowało, po około 170 latach, opracowaniem klasyfikacji określającej różne typy zapalenia trzustki [2,3]. Ostre zapalenie trzustki jest powszechną chorobą zapalną, dotyczącą od 13 do 45 osób na 100 000 mieszkańców w populacji wschodnioeuropejskiej. W Polsce wschodniej, w województwie świętokrzyskim zachorowalność w 2016 roku wynosiła 99,9/100 000 mieszkańców [4]. Wydaje się, że główną rolę w rozwoju ostrego zapalenia trzustki odgrywają czynniki środowiskowe oraz dieta, jednak jak to jest w przypadku innych chorób, w miarę rozwoju metod biologii molekularnej zaczęto podejrzewać wpływ czynnika genetycznego,

a masowe badania populacyjne tylko potwierdzają ten fakt. Poniżej przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat epidemiologii, etiologii oraz możliwych następstw ostrego zapalenia trzustki.

### **1.1 Epidemiologia ostrego zapalenia trzustki**

Ostre zapalenie trzustki jest powszechną i potencjalnie śmiertelną chorobą układu pokarmowego. W ciągu ostatnich dziesięciu lat OZT stało się jednym z ważniejszych problemów związanych z zaburzeniami układu pokarmowego, a liczba przypadków wzrosła na terenie Europy, Azji i Ameryki Północnej [5–7]. W skali światowej, w 1990 roku zdiagnozowano 1 727 789,3 (95% UI 1 452 132,4-2 059 695,3) przypadków natomiast w 2019 roku wartość ta wzrosła o około 63% i wyniosła 2 814 972,3 (95% UI 2 414 361,3-3 293 591,8). Dane w zależności od stref geograficznych wskazywały na najwyższy wskaźnik zachorowań we wschodniej Europie oraz w krajach o wysokich dochodach – Ameryka Północna zarówno w roku 2009 jak i w 2019 (Europa Wschodnia: 71,2 w 1990 i 79,6 w 2019 na 100 000 mieszkańców; Ameryka Północna: 62,4 w 1990 r. i 52,0 w 2019 r. na 100 000 mieszkańców). W większości regionów zaobserwowano stały roczny spadek wskaźnika zachorowalności w ciągu ostatnich 30 lat, jednak Azja Południowa i Wschodnia Europa wykazała gwałtowny wzrost (Azja południowa 12,8% 95% UI 10,9-14,9%, Europa wschodnia 11,7%, 95% UI 10,8-12,7%) [8–14]. W 2019 roku do krajów z najwyższą liczbą przypadków ostrego zapalenia trzustki zaliczono Indie (618 862,3 przypadków), Chiny (493 765,4 przypadków) i USA (228 699,2 przypadków). Najwyższy wskaźnik zachorowalności zaobserwowano w Rosji (82/100 000 przypadków), Ukrainie (77/100 000), Mołdawii (71,3/100 000), Białorusi (69,7/100 000), Słowacji (68,4/100 000), Litwie (64,8/100 000), Estonii (62,8/100 000) i Łotwie (61,7/100 000). W Polsce wskaźnik ten wynosi średnio 40,9 /100 000 mieszkańców [15]. W regionie świętokrzyskim wskaźnik zachorowań jest o wiele wyższy i wynosi 99,9/100 000 mieszkańców [16].

Ostre zapalenie trzustki charakteryzuje się również znacznym wskaźnikiem śmiertelności. Na świecie w 2019 roku odnotowano 115 053,2 przypadków śmiertelnych OZT (95% UI 104 301,4-128 173,4). W porównaniu do danych sprzed trzydziestu lat śmiertelność wzrosła o 64,8% (95% UI 55,3 -68,1%) (liczba przypadków w 1990 to 69 817,6 (95% UI 62 046,7-82 529,3)).

Dane literaturowe dotyczące wpływu płci na rozwój ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki różnią się w zależności od etiologii zapalenia oraz szerokości geograficznej. W ogólnym ujęciu, OZT diagnozowane jest tak samo często u kobiet i mężczyzn, jednak w przypadku mężczyzn obserwuje się wyższy współczynnik śmiertelności. Dodatkowo u mężczyzn częściej obserwowane są nawroty choroby. W następstwie, płęć męska predysponuje do rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki. Współczynnik zachorowalności na przewlekłe zapalenie trzustki u mężczyzn wynosi 12/100 000 przypadków u kobiet 6/100 000 przypadków [17,18].

## **1.2 Etiologia ostrego zapalenia trzustki**

Stan zapalny z definicji jest dynamiczną reakcją obronną organizmu, uruchamianą w wyniku stymulacji obu typów odporności, zarówno wrodzonej (nieswoistej), jak i nabytej (swoistej) [19]. Zapalenie trzustki zazwyczaj jest wywoływane przez czynniki inicjujące takie jak kamica żółciowa i nadmierne spożywanie alkoholu, rzadziej czynniki zakaźne. Złożona zależność pomiędzy czynnikiem genetycznym, a środowiskiem może wpływać na patogenezę i przebieg choroby. Powszechnie uznany paradygmat, że ostre zapalenie trzustki i przewlekłe zapalenie trzustki to różne jednostki chorobowe został zastąpiony koncepcją „kontinuum choroby” ponieważ 30% pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki przejdzie w stan przewlekły [20]. Głównymi przyczynami ostrego zapalenia trzustki są alkohol i kamienie żółciowe, stanowiące około 60-80% przypadków w zależności od szerokości geograficznej.

### **1.2.1 Kamica żółciowa**

Kamienie żółciowe są jedną z najczęstszych przyczyn wystąpienia ostrego zapalenia trzustki i stanowią 35-60% przypadków [21]. Badania wskazują, że w około 50% przypadków OZT u kobiet przyczyną są kamienie, natomiast u mężczyzn jest to tylko 15%. Około 20% populacji ma kamienie żółciowe, a ich obecność predysponuje pacjenta do wystąpienia ostrego zapalenia trzustki, podczas gdy 75% pacjentów z kamieniami żółciowymi pozostanie bez symptomów, u 8% pacjentów wystąpi OZT [6,22]. Zazwyczaj ostre zapalenie trzustki jest pierwszym objawem wystąpienia kamieni żółciowych, w zależności od pierwotnej lokalizacji, w której powstają. Chociaż u większość pacjentów z żółciowym ostrym zapaleniem trzustki dochodzi do całkowitego wyzdrowienia – po łagodnym epizodzie OZT, 15-30% rozwija ciężkie martwicze zapalenie trzustki, wymagające intensywnej opieki i multidyscyplinarnej strategii leczenia

[23]. W 1901 roku, Eugene Opie opisał prawdopodobny mechanizm powstawania zapalenia, w którym poprzez blokadę kanału trzustkowego dochodziło do zablokowania odpływu soku trzustkowego a w następstwie zapalenia [24]. Później, zmodyfikował teorię i opublikował pracę „*Common channel hypothesis*”, w której przewidywał, że powstanie połączenia kanału trzustkowego i kanału żółciowego w brodawce Vatera jest czynnikiem inicjującym zapalenie (teoria „wspólnego kanału”). Według tej teorii połączenie to powodowało napływ żółci (refluks) do kanału trzustkowego, co wiązało się z powstawaniem zapalenia. Teoria Opiego nie została jednak poparta wystarczającą liczbą dowodów zarówno klinicznych jak i eksperymentalnych, a badania wskazują, że powstanie połączenia nie jest czynnikiem gwarantującym powstawanie zapalenia [25]. Podsumowując, mechanizm inicjacji zapalenia opiera się na działaniu mechanicznym – kamienie żółciowe wywołują OZT kiedy blokują odpływ żółci i soku trzustkowego. Jednak to właśnie kumulacja enzymów trzustkowych i ich przedwczesna aktywacja prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń trzustki [26,27].

### **1.2.2 Alkohol**

Kolejną po kamieniach żółciowych przyczyną OZT jest nadmierne spożywanie alkoholu. Od ponad wieku alkohol był uznawany za główny czynnik etiologiczny OZT. Obecnie wiedza ta jest dobrze ugruntowana i poparta licznymi badaniami naukowymi [28,29]. Nieumiarkowane spożycie alkoholu może wywołać epizod ostrego zapalenia trzustki i zwiększać podatność na wystąpienie przewlekłego zapalenia trzustki (PZT). Szczyt zachorowań na OZT o podłożu alkoholowym przypada na 35 – 44 lata u mężczyzn i 25 – 34 u kobiet [7]. Określono, że spożycie alkoholu pomiędzy 50 – 80 g na dzień uszkadza komórki gruczołowe trzustki, należy jednak uwzględnić predyspozycje osobnicze [20]. Podczas gdy związek pomiędzy nadużywaniem alkoholu, a OZT jest udowodniony na podstawie danych epidemiologicznych, tylko niewielka część alkoholików rozwija OZT lub PZT. Oznacza to, że samo spożycie alkoholu rzadko jest jedynym czynnikiem wywołującym zapalenie trzustki, raczej alkohol uwrażliwia trzustkę na kofaktory, takie jak wysoki poziom lipidów, czynniki zakaźne, dym tytoniowy [30]. Alkohol jest eliminowany z organizmu przez wiele szlaków metabolicznych. Pierwsze enzymy zaangażowane w usuwanie alkoholu to dehydrogenaza aldehydowa (ALDH), dehydrogenaza alkoholowa (ADH), cytochrom P450 (CYP2E1) i katalaza. Mutacje w genach kodujących te enzymy mają wpływ na metabolizm alkoholu oraz zależne od alkoholu uszkodzenie tkanek. Podobnie jak wątroba, trzustka może

metabolizować alkohol dwoma ścieżkami: tlenową i beztlenową. Szlak tlenowy ADH i CYP2E1 metabolizuje etanol do aldehydu octowego, a podczas tego procesu powstają reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Należy zaznaczyć, że ROS to znany czynnik wywołujący stres komórkowy, często prowadzący do powstania stanu zapalnego. Produkty metabolizmu etanolu powstałe drogą beztlenową to estry etylowe kwasów tłuszczowych, które mogą uszkadzać komórki gruczołowe [31]. Zmiany w komórkach zrazikowych wywołane przez etanol i jego metabolity powodują wahania w poziomie jonów wapnia przez co zaburzają homeostazę [32], stres retikulum endoplazmatycznego (ERS) powoduje wzrost przepuszczalności błon, upośledzenie autofagii lub kolokację i aktywację lizosomalnych oraz trzustkowych enzymów trawiennych, co w efekcie prowadzi do procesu samotrawienia trzustki [20].

### **1.2.3 Hipertriglicerydemia**

Częstość występowania OZT związanego z podwyższonym poziomem trójglicerydów jest oszacowana na około 10 % przypadków [33]. Większość osób z podwyższonym poziomem trójglicerydów nie wykazuje objawów. Zostało ustalone, że podwyższony poziom trójglicerydów i chylomikronów w surowicy zwiększa lepkość krwi, prowadząc do miejscowego niedokrwienia tkanek. Podczas niedokrwienia metabolizm komórek zmienia się z tlenowego na beztlenowy, czyli glikolizę, której ostatecznym produktem jest L-mleczan. Pojawienie się mleczanu powoduje kwasicę, ta ostatnia zwiększa toksyczność kwasów tłuszczowych i jest prekursorem autoaktywacji trypsynogenu. Przy wystąpieniu innych czynników ryzyka, takich jak alkohol, dym tytoniowy lub leki może dojść do przejścia z niedokrwienia do miejscowego indukowanego OZT [34]. Pacjenci z rodzinnym niedoborem lipazy lipoproteinowej mają idiosynkratyczne ryzyko nawracających epizodów OZT [35]. Również kobiety w ciąży wykazują podwyższone ryzyko wystąpienia OZT ze względu na zmienny hormonalne powodujące wzrost cholesterolu i trójglicerydów [36]. Specyficzne różnice zostały stwierdzone pomiędzy pierwotną, a wtórną trójglicerydemią. Klasyfikacja Fredericksona wyróżnia pięć typów pierwotnej trójglicerydemii z czego typ I, IV i V jest związany z podwyższonym ryzykiem OZT. Typ I charakteryzuje się podwyższoną frakcją chylomikronów jak w przypadku niedoboru lipazy lipoproteinowej. Typ IV wykazuje wysoki poziom VLDL (ang. *very-low-density- lipoproteins*). Natomiast typ V wykazuje podwyższony poziom zarówno chylomikronów i VLDL, Pierwotna hipertriglicerydemia

ma podłoże genetyczne oparte na dziedziczeniu recesywnym (typ I) oraz dominującym (typ IV i V) autosomalnym [37,38].

Wtórna hipertriglicerydemia jest związana z otyłością, ciążą, nieleczoną cukrzycą, lekami, przewlekłym lub ostrym nadużywaniem alkoholu. Według klasyfikacji z Atlanty diagnostyka OZT o etiologii hipertriglicerydemii, wymaga określenia ilości triglicerydów w osoczu na poziomie 1000 mg/dL. Podwyższone ryzyko wystąpienia przynajmniej jednego ataku OZT wynosi ~20% w populacji gdzie poziom trójglicerydów wynosi powyżej 1000 mg/dL [37]. Murphy i wsp. odnotowali wzrost ryzyka o 4% dla pacjentów z podwyższeniem trójglicerydów o każde 100 mg/dL, nawet w przypadku wzrostu poniżej 1000 mg/dL [39].

#### **1.2.4 Zabiegi endoskopowe**

Patologie dróg trzustkowych i żółciowych są częstą przyczyną wykonywania ERCP (ang. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*). Możliwym powikłaniem po ERCP jest wystąpienie OZT. OZT post-ERCP o przebiegu ciężkim jest rzadkie (~0,5% przypadków zapalenia trzustki), ale w korelacji z innym czynnikiem predysponującym ryzyko wzrasta [40]. Powody wystąpienia OZT po ERCP podzielić można na: związane z pacjentem, z procedurą i operatorem zabiegu. Z pacjentem to wiek, płeć, anomalie anatomiczne (zwieracz przy przewodach żółciowych), wcześniej występujące OZT, trzustka żółciowa. Związane z operatorem zależą od doświadczenia endoskopisty, jak również wszystkich czynników śródoperacyjnych. Trudna kaniulacja brodawki Vatera może prowadzić do obrzęku, skurczu zwieracza, i niedrożności przewodu trzustkowego [41]. Osmolalność, pH i skład środka cieniującego może przyczyniać się do uszkodzenia chemicznego i hydrostatycznego. Podobnie zwiększone ciśnienie podczas wstrzykiwania środków kontrastowych może spowodować aktywację enzymów trawiennych, które następnie mogą powodować powstanie stanu zapalnego poprzez samotrąwienie organu [42–44].

#### **1.2.5 Inne rzadkie przyczyny OZT**

Uszkodzenie mechaniczne trzustki także może prowadzić do wystąpienia stanu zapalnego tego organu. Uszkodzenia trzustki spowodowane urazami są stosunkowo rzadkie i stanowią od <1% do 12% wszystkich urazów jamy brzusznej. Jednak samo uszkodzenie cechuje się wysoką śmiertelnością na poziomie od 2% do 40% [45,46]. Innym rzadkim czynnikiem ostrego zapalenia trzustki mogą być niektóre leki (0,1-2%

przypadków OZT), Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) opublikowała listę 525 różnych leków mających prawdopodobny wpływ na wystąpienie OZT [47]. Patomechanizm polekowego OZT jest specyficzny dla mechanizmu działania chemioterapeutyku [48]. Powszechnie znane leki mogące wywołać OZT należą do grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (miejscowy obrzęk naczyniowo-ruchowy), statyny (toksyczność bezpośrednia i kumulacyjna), doustne środki antykoncepcyjne lub hormonalna terapia zastępcza, a w szczególności estrogen (hipertriglicydemia, miejscowa zakrzepica tętnic), leki moczopędne, terapia przeciwwirusowa (HIV), kwas walproinowy, leki przeciwcukrzycowe, środki takie jak GLP-1 mimetyki [47–50].

### **1.3 Znaczenie mutacji genetycznych w zapaleniach trzustki**

Patogeneza ostrego zapalenia trzustki jest niezwykle złożona. Istotną rolę odgrywa oddziaływanie pomiędzy czynnikami środowiskowymi, a predyspozycjami genetycznymi. Obecnie określono niewiele mutacji mających bezpośredni wpływ na wystąpienie ostrego zapalenia trzustki. Wyróżnia się kilka genów kandydujących, jak na przykład *PRSSI*, *SPINK1*, *CFTR*, *CTRC*, *CTSB*, *CASR*, *TRPV6* [51–54]. Pacjenci, u których stwierdzono polimorfizmy w tych genach są zaliczani do grupy podwyższonego ryzyka. Warto wspomnieć o polimorfizmach genów nie związanych z „regulacją wydzielania wewnątrztrzustkowego trypsyny” takich jak *CLDN2* [55] oraz *CPAI* [56]. Spekuluje się również nad zależnościami pomiędzy mutacjami *IL1B*, *IL6*, *IL18*, a podwyższonym ryzykiem wystąpienia OZT [57,58].

#### **1.3.1 Mutacje genu *SPINK1***

Gen *SPINK1* (ang. *Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 1*) koduje czynnik odpowiedzialny za inhibicję wydzielania trypsyny. Fizjologicznie rolą białka *SPINK1* razem z inhibitorem  $\alpha$ 1-antytrypsyny i  $\alpha$ 2-makroglobuliny jest zapobieganie przedwczesnej aktywacji enzymów trzustkowych i ochrona przed samotrąwieniem organu, *SPINK1* łączy się z około 20% wydzielanej trypsyny i powoduje inhibicję jej aktywności. Mutacje *SPINK1* są zaliczane do czynników zwiększających ryzyko PZT na drodze zmniejszenia lub utraty funkcji inhibitora trypsyny, co w konsekwencji prowadzi do przedwczesnej aktywacji enzymu i samotrąwienia organu [59]. W literaturze wymienia się mutację p.Asn34Ser jako czynnik zwiększający ryzyko wstąpienia PZT o różnej etiologii. Obecność mutacji

p.Asn34Ser zwiększa ryzyko wystąpienia nawrotu w OZT [60]. Według ostatnich badań mutacja p.Asn34Ser występowała u 20% pacjentów, u których wykryto mutację funkcjonalną genu *TRPV6*. Sugeruje to, że tylko współwystępowanie mutacji warunkuje wystąpienie choroby. Mutacja zlokalizowana w miejscu wycinania intronów (*splicingowym*) *SPINK1* c.194+2T>C powoduje pominięcie ekspresji egzonu 3, a to właśnie tam zlokalizowane jest miejsce wiązania substratu. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia równowagi w układzie proteaza/antyproteaza. Szacunkowo nosicielstwo mutacji w miejscu *splicingowym* zwiększa szansę wystąpienia przewlekłego zapalenia trzustki 25-krotnie [61]. Mutacja p.Pro55Ser identyfikowana jest częściej w Europie i Stanach zjednoczonych w przeciwieństwie do populacji azjatyckich i również traktowana jest jako czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia OZT [52]. Mutacje w *SPINK1* mają również znaczenie w rozwoju raka trzustki [62].

### 1.3.2 Mutacje genu *CTRC*

Gen *CTRC* (ang. *chymotrypsin C*) koduje chymotrypsynę C, jeden z enzymów trzustkowych. Chymotrypsyna C odpowiada za degradację trypsyny poprzez selektywne zrywanie wiązania pomiędzy Leu<sup>31</sup> a Glu<sup>82</sup> jednocześnie tnąc wiązanie pomiędzy Arg<sup>122</sup> i Val<sup>123</sup>. Mutacje mające wpływ na ryzyko wystąpienia OZT zlokalizowane są w egzonie 3 oraz 7 i powodują zmniejszenie aktywności lub sekrecji enzymu. W konsekwencji dochodzi do przedwczesnej aktywacji trypsyny i zapalenia na drodze samotrawienia organu. Mikrodelecja p.Lys247\_Arg254del oraz mutacja p.Arg254Trp zwiększają ryzyko wystąpienia PZT odpowiednio 3- i 11-krotnie w populacji europejskiej [63]. Mutacje p.Ala73Thr i p.Val235Ile zidentyfikowane w populacji indyjskiej zwiększają ryzyko wystąpienia OZT odpowiednio 8- i 3-krotnie [64]. Dodatkowo mutacja p.Glu225Ala zwiększa ryzyko wystąpienia raka trzustki [65]. Polimorfizm p.Gly60=; c.180C>T określany jest jako czynnik zwiększający ryzyko progresji OZT do PZT zwłaszcza jeśli występuje u nosicieli mutacji w genach *SPINK1*, *CFTR* lub w połączeniu z innymi czynnikami jak nadmiernym spożywaniem alkoholu oraz paleniem tytoniu [66].

### 1.3.3 Mutacje genu *CFTR*

Gen *CFTR* (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) koduje białko zaangażowane w transport jonów sodu, chloru oraz wodorowęglanów tworząc kanał w błonie komórkowej. Nieprawidłowe działanie kanałów zaburza gospodarkę płynową organu powodując zmniejszone wydzielanie insuliny i enzymów trawiennych. Ma również wpływ na obniżenie pH w świetle kanałów trzustkowych, co w konsekwencji

proceeds to precipitation of protein and blockage of it. Disturbance of pH of pancreatic juice may also lead to premature activation of enzymes and self-digestion of the organ [67]. Exocrine insufficiency of the pancreas occurs in about 85 – 95 % of patients with mucopolysaccharidosis. It was estimated that inflammation of the pancreas can develop in an average of 1.5 % of patients with mucopolysaccharidosis [68]. Do mutations of important ones are counted mutation p.Arg254Trp causing decreased secretion of enzyme decreasing activity of CTFC (p.Val235Ile) and decreasing amount of CTFC mRNA (p.Gly60=)[63,69,70].

#### **1.3.4 Mutacje genu *PRSSI* i *PRSS2***

Gen *PRSSI* (ang. *serine protease 1*) codes one of three forms of trypsinogen. Mutations in the gene *PRSSI* have an important role in the case of a rare inherited inflammation of the pancreas. In 1996 for the first time a mutation p.Arg122His, as a mutation causing chronic inflammation of the pancreas [71]. The degree of penetration of a given mutation is different depending on the geographical area. Mutation p.Arg122Cys occurs in 40 % of patients with inherited inflammation of the pancreas in Spain [72], mutation p.Ala16Val in 43 % in Europe [73], mutations p.Asn29Ile and p.Arg122His in 80 % in the United States [74]. In France characteristic mutations are p.Asn29Ile and p.Arg122His occurring in 93% of inherited inflammation of the pancreas [75], while in England the same mutations occur in 96 % of patients [76,77]. The mentioned mutations increase the risk of occurrence of OZT, but not through the same biological mechanism. Mutation p.Arg122His causes inhibition of deactivation of trypsin, which increases its stability and increases the level of enzyme in the pancreas. This leads to the occurrence of inflammation through the mechanism of self-digestion of the organ [78]. Mutation p.Ala16Val is localized in an active site and causes increased cleavage of N-terminal amino acids (autoactivation) on the way to activity of CTFC. Mutation p.Asn29Ile affects two mechanisms of degradation and autoactivation of trypsinogen [78].

Mutations in the gene *PRSS2* (ang. *Serine Protease 2*) coding another isoform of trypsinogen have a protective character. Mutation p.Gly161Arg occurs less often in patients with PZT, than in controls both in the European population and in the Chinese. Mutation has a protective character, and its occurrence reduces intracellular activity of trypsin [79,80]. As yet no mutation of the gene *PRSS2* increasing the risk of occurrence of PZT or OZT [81].

### 1.3.5 Mutacje genu *CPAI*

Gen *CPAI* koduje enzym trzustkowy - karboksypeptydazę. W obrębie genu zlokalizowano mutacje, które zwiększają ryzyko wystąpienia PZT: p.Arg382Trp, p.Tyr358fs, p.Asn256Lys występujące w populacji niemieckiej, p.Tyr314Cys w populacji europejskiej, p.Y308H w populacji indyjskiej. Żadna z tych mutacji nie była zidentyfikowana u osób zdrowych, a częstość występowania u chorych nie przekraczała 1 % [56,82]. Wystąpienie którejkolwiek mutacji funkcjonalnej statystycznie istotnie zwiększało ryzyko wystąpienia OZT [81]. Mutacje p.Arg23Cys, p.Leu134fs, p.Thr164Met, p.Arg234His, p.Arg240Gln, p.Tyr318fs, p.Trp367Cys, p.Arg386Cys, p.Thr409ins(c.1226C>ccatcatggagcacaccctgaatca) powodują zmniejszenie sekrecji enzymu oraz wystąpienie stresu siateczki śródplazmatycznej [83]. Najczęściej identyfikowaną mutacją była p.Asn256Lys, zaobserwowaną ją u 0,7% (7/944) badanych chorych na OZT[56]. Ryzyko wystąpienia zapalenia trzustki u nosicieli mutacji było 38-razy wyższe u osób poniżej 20 roku życia oraz 84-razy wyższe u dzieci poniżej 10 roku życia. Badania na modelu mysim wykazały, że mutacja p.Asn256Lys spowodowała wystąpienie PZT. Badania wskazują na zależność pomiędzy mutacją p.Ser282Pro, a ryzykiem wystąpienia dziedzicznego zapalenia trzustki w modelu autosomalnym dominującym [84].

### 1.3.6 Mutacje *TRPV6*

Gen *TRPV6* kodujący białko błonowe kanału wapniowego, które jest szczególnie zaangażowane w pierwszym etapie wchłaniania  $Ca^{2+}$  w jelicie [85]. Mutacje p.Ile223Thr i p.Asp324Asn nie wpływające na funkcję białka dziesięciokrotnie zwiększały ryzyko wystąpienia PZT w populacji japońskiej. Mutacja p.Leu299Gly dominująca w populacji europejskiej trzykrotnie zwiększała ryzyko PZT [86]. Mutacje p.Leu576Arg i p.Val239SerfsX53 w połączeniu z rodzinnym obciążeniem zwiększały ryzyko PZT. Odkrycie zależności pomiędzy mutacjami *TRPV6*, a ryzykiem wystąpienia zapalenia trzustki sugeruje nowy mechanizm powstawania zapalenia – zaburzenia homeostazy wapniowej. Wraz z wariantami patogennymi *TRPV6* obserwowano występowanie mutacji *SPINK1* p.Asn34Ser i *CFTR* (p.Val235Ile i p.Phe508del) [87].

## 1.4 Obraz kliniczny ostrego zapalenia trzustki

Ostre zapalenie trzustki jest stanem zapalnym narządu i chorobą ogólnoustrojową, klinicznie charakteryzuje się ostrym bólem nadbrzusza z jednoczesnym wzrostem

aktywności enzymów trzustkowych w surowicy [88]. Powszechnie stosowana klasyfikacja ostrego zapalenia trzustki została po raz pierwszy przedstawiona w 1992 roku w Atlancie, a wprowadzenie ujednoczonego podziału umożliwiło standaryzację w zgłoszeniach badań jak również ułatwiło kontakt pomiędzy klinicystami [89]. W miarę rozwoju technik diagnostycznych, oraz postępu naukowego dotyczącego etiologii i patofizjologii OZT, w 2012 roku klasyfikacja z Atlanty została poddana rewizji przez panel specjalistów [89,90]. Obecnie rozpoznanie ostrego zapalenia trzustki wymaga stwierdzenia dwóch z trzech poniższych cech: (1) bólu brzucha odpowiadającego ostremu zapaleniu trzustki (ostry początek uporczywego, silnego bólu w nadbrzuszu, często promieniującego do pleców); (2) aktywności lipazy w surowicy (lub aktywności amylazy) co najmniej trzy razy większej, niż górna granica normy; i (3) charakterystycznych objawów ostrego zapalenia trzustki stwierdzonych na podstawie metod obrazowania: tomografii komputerowej po podaniu kontrastu (ang. *contrast-enhanced computed tomography*, CECT), rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) lub ultrasonografii przezbrzuszej (USG) [89].

#### **1.4.1 Stopnie ciężkości choroby i jej powikłania**

Nowa klasyfikacja powstała w 2012 roku i wyróżnia trzy stopnie ciężkości ostrego zapalenia trzustki:

- łagodne – ustępuje po kilku dniach lub w ciągu tygodnia, nie występuje niewydolność narządowa ani powikłania miejscowe i ogólnoustrojowe,
- umiarkowane – objawy utrzymują się dłużej niż w przypadku postaci łagodnej, stan może wymagać interwencji medycznej i dłuższej hospitalizacji, występuje przemijająca niewydolność narządowa (<48 godzin). Obserwuje się powikłania miejscowe i/lub ogólnoustrojowe, jednak bez przetrwałej niewydolności narządowej,
- postać ciężka – charakteryzuje się długą hospitalizacją, zazwyczaj z koniecznością wybranej interwencji medycznej; występuje przetrwała niewydolność wielonarządowa, a ryzyko zgonu w tej grupie jest szczególnie wysokie [89].

Powikłania miejscowe to najczęściej ostre okołotrzustkowe zbiorniki płynu, torbiele rzekome trzustki, ostre zbiorniki martwicze, martwica otorbiona, martwica okrężnicy jak również zakrzepica żyły śledzionowej lub żyły wrotnej i mechaniczne zaburzenie

opróżniania żołądka [91]. Stwierdzono, że następstwem OZT może być pojedyncza dysfunkcja narządowa lub pełna niewydolność jednego lub kilku narządów. Najczęściej występującą dysfunkcją pojedynczego narządu jest dysfunkcja płuc, często zajętymi narządami są również nerki, wątroba, układ sercowo-naczyniowy. Powikłania obejmują niewydolność oddechową, niewydolność krążenia, ostrą niewydolność nerek (ONN), zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej z potwierdzoną infekcją (sepsę), zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. *disseminated intravascular coagulation* - DIC), encefalopatię metaboliczną [34,92].

#### **1.4.2 Prognozowanie przebiegu OZT**

W celu prognozowania przebiegu OZT stosuje się wieloczynnikowe skale kliniczne takie jak skala Ransona, skala Glasgow, BISAP – (ang. *The Bedside Index for Severity in Acute Pancreatitis*), skala APACHE II (ang. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) o różnej czułości i specyficzności. Najbardziej powszechna jest skala BISAP w połączeniu z oznaczeniem białka C-reaktywnego (*C-reactive protein*, CRP). Inne mniej popularne wskaźniki to szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej (ang. *estimated glomerular filtration rate* – eGFR) lub D-dimer, oznaczany w pierwszej dobie OZT [93,94].

#### **1.5 Ostre nawracające zapalenie trzustki i przewlekłe zapalenie trzustki**

Ostre nawracające zapalenie trzustki jest stanem klinicznym charakteryzującym się powtarzającymi się epizodami ostrego zapalenia trzustki. Ostre nawracające zapalenie trzustki jest zatem diagnozowane retrospektywnie z definicji klinicznej po co najmniej drugim epizodzie OZT [95]. Zaobserwowano, że po wystąpieniu pierwszego epizodu OZT, nawrót występuje u 11 – 32 % pacjentów skutkując zdiagnozowaniem nawracającego OZT [96,97].

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) jest powszechnie definiowane jako trwający, przewlekły proces zapalny trzustki, charakteryzujący się nieodwracalnymi zmianami morfologicznymi [98]. Etiologia przejścia OZT w PZT jest zróżnicowana. Zaproponowano klasyfikację czynników ryzyka przewlekłego zapalenia trzustki TIGAR-O, w której wyróżniono 6 grup czynników etiologicznych: toksyczno-metaboliczne (T), idiopatyczne (I), genetyczne (G), autoimmunologiczne (A), nawracające lub ciężkie ostre zapalenie trzustki (R od ang. *Recurrent*), zaporowe (O od ang. *obstructive*) [99].

Widoczny jest jednak związek pomiędzy czynnikami środowiskowymi, genetycznymi, a ryzykiem przejścia w stan przewlekły (Tab. 1).

Tab. 1 Przegląd znanych czynników ryzyka ostrego zapalenia trzustki, związanego z nimi patomechanizmu oraz wynikającego prawdopodobieństwa przejścia w stan przewlekły. (Opracowanie własne na podstawie Weiss i wsp. [20]).

Czynnik ryzyka OZT	Prawdopodobny patomechanizm	Ryzyko przejścia w stan przewlekły
Nadużywanie alkoholu	zależne od dawki uszkodzenie komórek	↑↑
Palenie tytoniu	zależne od dawki uszkodzenie komórek	↑↑
Kamienie żółciowe	Niedrożność przewodu trzustkowego	-
Hipertriglicydemia	Zmieniona lepkość krwi, miejscowe niedotlenienie tkanek	↑↑*
Zabiegi endoskopowe (ERCP)	uszkodzenie komórek, zwiększone ciśnienie w kanale	-
Urazy brzucha	Uszkodzenie tkanki trzustki	↑↑**
Leki	Cytotoksyczność lub w efekcie przemian metabolicznych	-
Choroby autoimmunologiczne	Infiltracja komórek układu odpornościowego	↑↑
<b>Mutacje <i>PRSSI</i> (dominujące)</b>	<b>Podniesiona aktywność trypsyny</b>	<b>↑↑↑</b>
<b>Mutacje genetyczne predysponujące: <i>SPINK1</i>, <i>CFTR</i>, <i>PRSSI</i></b>	<b>Aktywacja proteaz, stres siateczki śródplazmatycznej</b>	<b>↑↑</b>
Infekcje	Miejscowe uszkodzenia tkanki	-

- nie określono ↑↑ - wysokie ryzyko, ↑↑↑ - bardzo wysokie ryzyko, \* - w przypadku rodzinnej hipertriglicydemii, \*\* - w przypadku zespołu przerwanego przewodu

## 1.6 Mechanizm powstawania zapalenia

Zapalenie jest odpowiedzią układu odpornościowego na szkodliwe bodźce, takie jak patogeny, uszkodzenie komórek, toksyczne związki chemiczne lub napromieniowanie. Mechanizm opiera się na usunięciu szkodliwego bodźca oraz inicjowanie procesu gojenia [100]. Zapalenie jest zatem mechanizmem obronnym, który jest niezbędny dla zdrowia. Zwykle w ostrych stanach zapalnych odpowiedź komórkowa i molekularne interakcje

skutecznie minimalizują następujące w wyniku działania bodźca uszkodzenia i infekcje. Ten proces łagodzenia przyczynia się do odbudowy homeostazy tkanki i ustąpienia ostrego zapalenia. Zapalenie na poziomie tkankowym charakteryzuje się zaczerwienieniem, obrzękiem, podwyższoną temperaturą miejsca, w którym wystąpiło, bólem, utratą funkcji tkanki. Te następstwa wynikają z odpowiedzi miejscowej układu odpornościowego, układu naczyniowego i reakcji zapalnej komórek w odpowiedzi na infekcję lub uraz. Odpowiedź układu mikrokrążenia, która występuje podczas procesów zapalnych obejmuje zmniejszenie przepuszczalności naczyń, chemotaksje leukocytów do miejsc uszkodzonych wytwarzanie cytokin przez reaktywowane leukocyty [101]. Odpowiedź immunologiczna to skoordynowana aktywacja szlaków sygnałowych, które regulują poziom mediatorów zapalnych w rezydentnych komórkach oraz wychwytyują komórki zapalne z krwi. Chociaż proces zapalny zależy od czynnika zapalnego oraz jego lokalizacji w ciele, wszystkie mechanizmy można uprościć do jednego schematu: 1) receptory powierzchniowe komórek rozpoznają czynnik, 2) następuje aktywacja drogi zapalenia, 3) następuje uwolnienie markerów zapalenia, 4) komórki zaangażowane w procesy zapalne zostają aktywowane [102]. Odnotowano, że może dojść do niekontrolowanego przejścia stanu ostrego w stan przewlekły. Zapalenie jest powszechnym czynnikiem inicjującym wiele chorób przewlekłych takich jak choroby krążenia, cukrzyca, choroby jelit. Zapalenie może również inicjować proces nowotworowy [100]. Zapalenie trzustki charakteryzuje się destrukcją komórek zrazikowych trzustki i aktywacją komórek zapalnych takich jak makrofagi, neutrofile, granulocyty, które wydzielają cytokiny zapalne. Te cytokiny aktywują następnie komórki gwiaździste trzustki (ang. *Pancreatic stellate cells*, PSCs), które promują przejście zapalenia w stan przewlekły [103]. Rozwój zapalenia trzustki wymaga aktywacji kilku kluczowych dróg zapalenia takich jak szlak kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor kappa-B*, NF-κB) i szlak sygnałowy JAK-STAT (*Janus kinase - signal transducer and activator of transcription*) [104,105]. Wśród mediatorów zapalenia zaangażowanych

w wystąpieniu OZT można wyróżnić wiele cytokin (np. TNF-alfa, Interleukiny 1β, IL-2, IL-6 i IL-18), chemokin (IL-8, MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, MIP-1, ang. *macrophag inflammatory protein-1*, GRO-α, ang. *growth-related oncogene alfa*) cząsteczek adhezyjnych, czynników aktywujących płytki krwi oraz reaktywne formy tlenu i azotu [101].

## 1.7 Stres siateczki śródplazmatycznej i jego rola w ostrym zapaleniu trzustki

Retikulum endoplazmatyczne (ER) jest jednym z najważniejszych organeli komórkowych odpowiadającym za regulację syntezy białek, jego fałdowanie i agregację, bierze również udział w metabolizmie lipidów i węglowodanów. Organelum odpowiedzialne jest również za detoksyfikację. Stres siateczki śródplazmatycznej (ERS) jest szczególnym subkomórkowym procesem patologicznym wpływającym na zaburzenia homeostazy komórki i zaburzeń w pracy ER [106]. Zapalenie i infekcja są dwoma głównymi czynnikami, które prowadzą do zmian w miejscowej homeostazie w organizmie przez co indukują stres siateczki śródplazmatycznej. ERS może być indukowany lub zwiększany poprzez zmiany w zapotrzebowaniu na energię, regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i produkcję ROS [107]. W warunkach patologicznych, aktywowane makrofagi mogą wydzielać wiele mediatorów zapalenia i stymulować aktywację innych komórek [108]. Dlatego ERS wpływa na stan zapalny poprzez interakcje różnych mechanizmów, jak również może mieć wpływ na uszkodzenie różnych organów. Komórki ssaków mogą indukować ekspresję białek stresu w celu obrony przed środowiskiem zewnętrznym jak również w odpowiedzi na błędy w syntezie białek. Najważniejszy mechanizm obronny to mechanizm UPR (ang. *Unfolded protein response*) [107]. W komórkach ssaków UPR jest aktywowany poprzez trzy szlaki, każdy jest aktywowany przez inny sensor błony komórkowej: IRE1 $\alpha$  (ang. *inositol-requiring kinase 1 $\alpha$* ), PERK (ang. *pancreatic ER eIF2 $\alpha$  kinase*) i ATF6 $\alpha$  (ang. *activateing transcription factor  $\alpha$* ). W przypadku braku stresu ER białko opiekuńcze BiP wiąże w świetle ER trzy białka-sensory zapobiegając ich aktywacji. W przypadku wystąpienia ER białko opiekuńcze dysocjuje od domen lumenalnych i aktywuje trzy szlaki UPR [109,110]. Najbardziej konserwatywną drogą aktywacji UPR jest szlak IRE1 $\alpha$ . IRE1 $\alpha$  jest białkiem transbłonowym typu I zawierającym w części cytozolu domeny Ser/Thr oraz domenę endorybonukleazy (RNase). Podczas uwolnienia inhibitora BiP, część cytozolowa IRE1 $\alpha$  ulega homooligomeryzacji i trans-autofosforylacji, co aktywuje jej właściwości kinazy i RNazy. Aktywność endorybonukleazy IRE1 $\alpha$  polega na wycięciu i usunięciu 26-nukleotydowego intronu z mRNA kodującego XBP1 (ang. *X-box-binding protein-1*), w efekcie następuje translacyjne przesunięcie ramki odczytu i synteza czynnika transkrypcyjnego o budowie zamka leucynowego. Dojrzałe białko XBP1 jest kluczowym transkrypcyjnym aktywatorem wielu genów UPR, białek opiekuńczych regulujących fałdowanie i transport białek w ER, biosyntezę fosfolipidów,

ekspansję błony ER i degradację białek związaną z ER (ERAD – ang. *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*). Badania wskazują, że szlak IRE $\alpha$ -XBP1 jest jednym z etapów kilku ścieżek odpowiedzi na stres komórkowy. W pierwszej poprzez aktywację domeny kinazy IRE1 $\alpha$ , która łączy się z białkiem TRAF2 (*TNF $\alpha$  receptor-associated factor 2*) w cytoplazmie prowadząc do fosforylacji TRAF2 i późniejszej aktywacji czynników NF- $\kappa$ B i JNK (ang. *c-Jun N terminal kinase*), co indukuje zapalenie i uruchamia szlaki pro-apoptotyczne w komórce [111]. Kolejny szlak angażuje białko IRE1 $\alpha$ , które wiąże się do białek Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*) i Bak (ang. *Bcl-2 Antagonist/Killer 1*) na błonie zewnętrznej mitochondrium, a to prowadzi do zależnej od mitochondrium śmierci komórkowej. Do tej pory XBP1 był jedynym znanym substratem dla IRE1 $\alpha$ . Podczas stresu siateczki śródplazmatycznej domena endonukleazowa białka IRE1 $\alpha$  została zidentyfikowana jako endorybonukleaza działająca na zlokalizowane w ER mRNA, które są degradowane w procesie RIDD (ang. *regulates IRE1-dependent Decay*) w mechanizmie, który później zmniejsza stres ER [106]. Dodatkowo RIDD został połączony z aktywacją translacji genu RIG-1 (ang. *retionic-acid-inducible gene-1*), który aktywuje autologiczną odpowiedź zapalną, której pośredniczy NF- $\kappa$ B. Zwiększa to odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusom RNA[112]. Droga IRE1- $\alpha$ -RIDD-RIG1 sugeruje ważną rolę stresu ER w nadzorze immunologicznym oraz reakcji na stres mikrobiologiczny.

Kolejna gałąź szlaku sygnałowego UPR angażuje białko PERK, które jest również białkiem transmembranowym typu I z domeną kinazową Ser/Thr w części cytozolu. Podczas aktywacji BiP związanej z odpowiedzią na stres ER, PERK staje się aktywne na drodze analogicznej do białka IRE1 $\alpha$ . Aktywowany PERK fosforyluje Ser<sup>51</sup> podjednostki  $\alpha$  eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (eIF2 $\alpha$ ), który konkuruje z eIF2B i zmniejsza szybkość translacji białka powodując w ten sposób zmniejszoną syntezę białka w całej komórce. W konsekwencji dochodzi do zmniejszenia obciążenia związanego z fałdowaniem białka w ER. Oprócz hamowania syntezy białka eIF2 $\alpha$  odgrywają również unikalną rolę w selektywnym promowaniu translacji grupy mRNA, a w szczególności mRNA kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP, czyli ATF4[113]. ATF4 jest kluczowym białkiem w kilku szlakach odpowiedzi na stres, który indukuje ekspresję związanych z UPR zapalnych cząstek sygnałowych, białek opiekuńczych ER, białek transportowych, antyoksydacyjnej odpowiedzi na stres i autofagii. Następnym celem ATF4 jest białko CHOP (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein homologous*),

które promuje stres oksydacyjny i apoptozę poprzez wiele szlaków, łącznie z oksydazą ER 1 $\alpha$  i kinazą II zależną od Ca<sup>2+</sup>/ kalmoduliny (CAMK II). CHOP jest również połączone z białkiem Bcl-2, pro-apoptycznym białkiem Bim (ang. *Bcl-2 apoptotic protein*), TRB3 (ang. *telomere repeat binding factor 3*) i DR5 (ang. *death receptor 5*) [114].

Trzecia gałąź UPR związana jest ze szlakiem ATF6 $\alpha$ . Jest białkiem transbłonowym typu II z domeną CREB/ATF (ang. *cAMP response element binding protein /Activating transcription factors*) i bZIP w N-końcowej części cytoplazmatycznej. Należy do rodziny czynników transkrypcyjnych regulowanych przez proteolizę wewnątrzbłonową (RIP) regulujących czynniki transkrypcyjne bZIP. Podczas dysocjacji BiP, w odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej, ATF6 $\alpha$  przemieszcza się do aparatu Golgiego gdzie zostaje przecięty w swojej domenie luminalnej i regionie przezbłonowym odpowiednio przez proteazę miejsca 1 (S1P, site-1 protease) i proteazę S2P. Poprzez przecięcie zostaje uwolniony wolny fragment p50, który migruje do jądra komórkowego, a aktywowany ATF6 $\alpha$  następnie stymuluje ekspresję białek opiekuńczych ER, czynników transkrypcyjnych, poszczególnych składników ERAD i biogenezy ER. Dysfunkcja szlaku ATF6 $\alpha$  została powiązana z wieloma chorobami. Mutacje w *ATF6 $\alpha$* , które wyciszają jej aktywność translacyjną w odpowiedzi na ERS są związane z chorobami oczu takimi jak ślepotą barw i obniżona ostrość widzenia [115,116].

Komórki zrazikowe trzustki są wyposażone w obficie rozbudowaną strukturę siateczki śródplazmatycznej aby dostosować się do ich fizjologicznej funkcji jaką jest synteza enzymów trawiennych. Wiele nowo zsyntezowanych enzymów jest transportowanych do ER i wiąże się z BiP. BiP wykazuje aktywność ATPazy i bazuje na reakcjach zużywających energię powstającą z ATP na drodze hydrolizy i wspomaga prawidłowe fałdowanie oraz dojrzewanie post-translacyjne białek, które następnie są umieszczane w granulach zymogenu w aparacie Golgiego i wydzielane do środowiska zewnątrzkomórkowego [117]. Komórki trzustki są bardziej podatne na bodźce zewnętrzne w przypadku zaburzeń pracy ER [118].

## **1.8 Enzymy trzustkowe synteza i transport**

Komórki zrazikowe części zewnątrzwydzielniczej trzustki charakteryzują się najwyższą zdolnością do syntezy białek w każdym organizmie należącym do grupy ssaków.

Komórki zrazikowe są bowiem wyposażone w wysoce rozwinięty system reticulum endoplazmatycznego zdolny do modyfikacji i transportu nowo zsyntezowanych białek przez szlaki wydzielnicze. Oprócz funkcji związanych z syntezą i przetwarzaniem białek, ER jest głównym miejscem magazynowania wewnątrzkomórkowego wapnia, który po uwolnieniu do cytoplazmy jest mediatorem regulowanego wydzielania zmagazynowanych enzymów trawiennych do układu trzustkowego. Każde białko syntezowane w ER musi podlegać specyficznym wtórnym modyfikacjom, a także fałdowaniu aby zostało odpowiednio przetransportowane do docelowych organelli takich jak aparat Golgiego, ziarnistości zymogenu (magazynu enzymów trawiennych) oraz lizosomów lub miejsc w błonie [119]. Ziarnistości zymogenu magazynują enzymy trawienne, które są uwalniane w wyniku egzocytozy ze stymulacją neurohumoralną podczas posiłku, jak opisano poniżej. Ponadto systemy zarówno syntezy jak i przetwarzania białek muszą być w stanie dostosować się do zmiennego zapotrzebowania na syntezę białek w diecie oraz do wpływu czynników środowiskowych takich jak alkohol, palenie, zmieniony metabolizm i ksenobiotyki [120]. Aminokwasy niezbędne do budowy enzymów są transportowane z włosowatego naczynia krwionośnego do komórki pęcherzykowej. Następnie w siateczce śródplazmatycznej odbywa się synteza białek enzymatycznych i ich transport wewnątrz komórki do ziarnistości (granul zymogenu) umiejscowionych w pobliżu światła pęcherzyka trzustkowego. Aby zapobiec procesom trawienia w obrębie samej trzustki, enzymy są wytwarzane i magazynowane w formie proenzymów [119]. Regulacja czynności zewnątrzwydzielniczej trzustki jest procesem bardzo złożonym i odbywa się pod kontrolą autonomicznego układu nerwowego (nerw błędny i trzewny) oraz pod wpływem wydzielanych w przewodzie pokarmowym hormonów (enterohormonów), z których najważniejsze to gastryna i cholecystokinina. Pobudzenie czynnościowe trzustki związane ze spożywaniem pokarmów przebiega w kilku etapach: głowowej, żołądkowej i jelitowej. W fazie głowowej, pod wpływem działania bodźców wzrokowych, węchowych, żucia i połykania pokarmu, następuje pobudzenie nerwu błędnego, a za jego pośrednictwem uwalnianie niektórych hormonów jelitowych (np. gastryny) i neuropeptydów, co powoduje pobudzenie czynności zewnątrzwydzielniczej trzustki. W fazie żołądkowej na skutek obecności pokarmu w żołądku oraz rozciągania jego ścian, zostaje pobudzony nerw błędny. W wyniku wstępnego działania pepsyn żołądkowych następuje uwalnianie peptydów i aminokwasów ze spożytych pokarmów, co pobudza wydzielanie cholecystokininy w dwunastnicy. Powoduje to z kolei wydzielanie soku trzustkowego o stosunkowo małej

objętości, ale o dużej zawartości enzymów. Największe znaczenie dla zewnątrzwydzielniczej czynności trzustki ma faza jelitowa, w której produkty wstępnego trawienia w żołądku (peptydy, aminokwasy) oraz kwaśna zawartość żołądkowa po przejściu do jelita powodują uwalnianie sekretyny i cholecystokininy z błony śluzowej dwunastnicy oraz pobudzają na drodze nerwowej wydzielnicze odruchy jelitowo-trzustkowe. W tej fazie następuje bardzo silne pobudzenie zewnętrznego wydzielania trzustki, a sok trzustkowy ma dużą objętość i jest bogaty w enzymy trawienne i wodorowęglany [119].

### 1.9 Enzymy proteolityczne trzustki

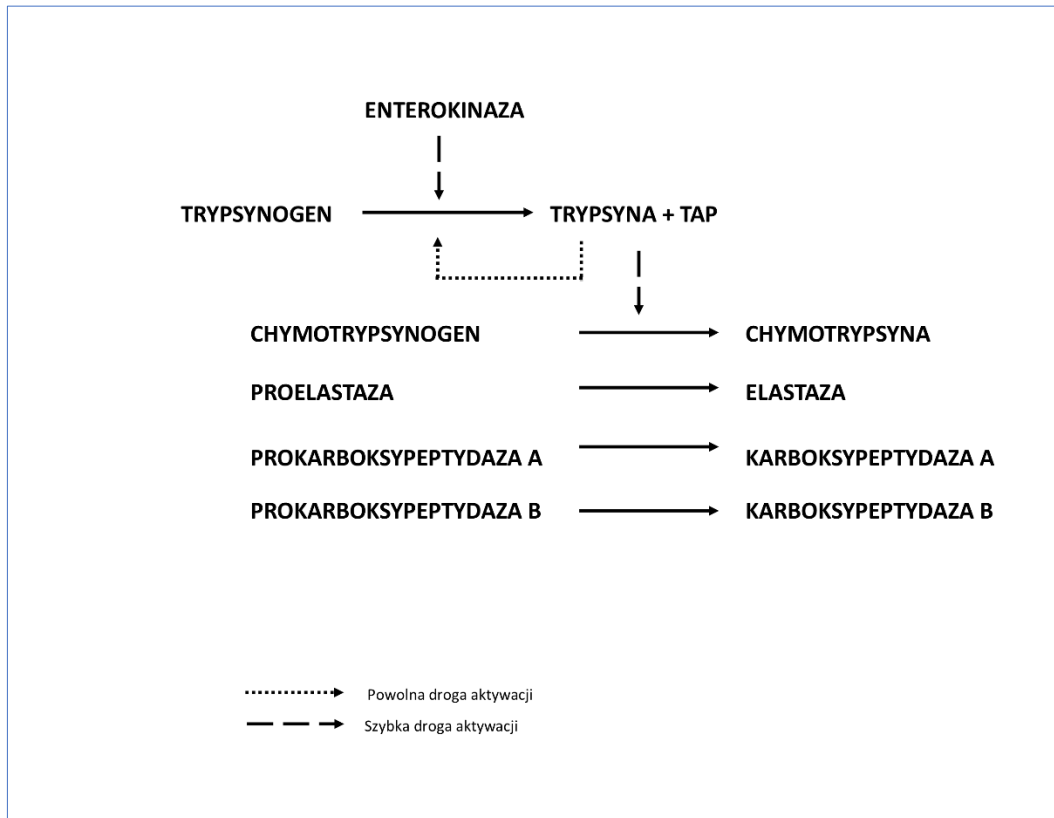
Białka stanowią około 10% zapotrzebowania kalorycznego w diecie wschodniej. Białka, które są trawione do aminokwasów stanowią podstawowy i niezbędny budulec do prawidłowego wzrostu i funkcjonowania organizmu. Zróżnicowanie oraz złożona budowa białek sprawiają, że ponad 80% enzymów trzustkowych stanowią proteazy, a wiele dodatkowych enzymów tej klasy jest wydzielanych w przewodzie pokarmowym, zwłaszcza w żołądku i jelicie cienkim. W żołądku produkowany jest pepsynogen, który hydrolizuje wiązania białkowe pomiędzy fenyloalaniną, tyrozyną i leucyną [121]. Natomiast enterocyty w jelicie cienkim produkują wiele aminopeptydaz, dwie karboksypeptydazy, dwie enteropeptydazy i gamma-glutamylotranspeptydazę. Enteropeptydaza jest enzymem odpowiedzialnym za aktywację trypsyny. Trypsynogeny podobnie jak pozostałe enzymy trzustkowe syntezowane są w formie pre-pro-enzymów zawierających 15-aminokwasowy peptyd sygnałowy i 8-aminokwasowy pro-peptyd, peptyd aktywujący peptyd TAP (ang. *trypsinogen activation peptide*) [121,122].

Wśród enzymów proteolitycznych trzustki należy wymienić:

- trypsinogen (trypsyna) – tnie wiązanie wewnętrzne przy resztach lizyny lub argininy, aktywuje pozostałe enzymy trzustkowe t. j. trypsinogen kationowy (PRSS1), trypsinogen anionowy (PRSS2) i mezotrypsynę (PRSS3),
- chymotrypsynogeny (chymotrypsyny) A i B – rozszczepiają wiązania peptydowe, przez co cząsteczki białka dzielą się na drobnocząsteczkowe peptydy (działanie endopeptydazy),
- karboksypeptydazy A (CPA) i B (CPB) – oddzielają pojedyncze aminokwasy przy końcu węglowym cząsteczki (egzopeptydazy),

- elastaza – hydrolizuje włókna tkanki łącznej, nukleazy hydrolizujące kwasy nukleinowe.

Schemat aktywacji enzymów trzustkowych przedstawiono na Rycinie 1:



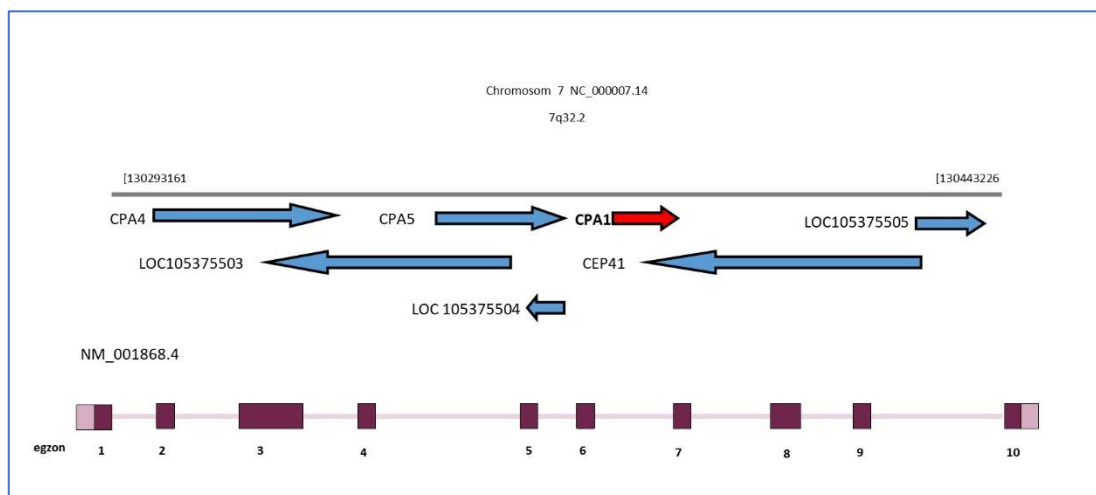
Ryc. 1 Schemat aktywacji enzymów proteolitycznych, TAP- *trypsinogen activation peptide*. Peptyd aktywujący trypsinogen. [Opracowanie własne na podstawie *Pandol S.J. (2010)[119]*].

### 1.10 Karboksypeptydaza

Karboksypeptydaza to trzustkowa metaloproteaza, której funkcją jest hydrolizowanie C-końcowych wiązań peptydowych w łańcuchach białkowych dostarczanych w pokarmie. W soku trzustkowym opisano 3 izoformy tego enzymu. Typ A (CPA1 i CPA2) działają na aminokwasy aromatyczne i alifatyczne powstałe po trawieniu chymotrypsyną i elastazą. Natomiast typ B (CPB1) hydrolizuje C-końcowe reszty argininy i lizyny generowane przez trypsyny. Karboksypeptydaza A została wyizolowana i skryształizowana w 1937 roku i była jednym z pierwszych enzymów proteolitycznych, dla których podjęto znaczny wysiłek, aby zrozumieć złożoność jego kinetyki wobec aminokwasów acylowanych, dipeptydów i ich analogów estrowych. Była również pierwszą metaloproteazą i drugim enzymem „cynkowym”, który został zidentyfikowany

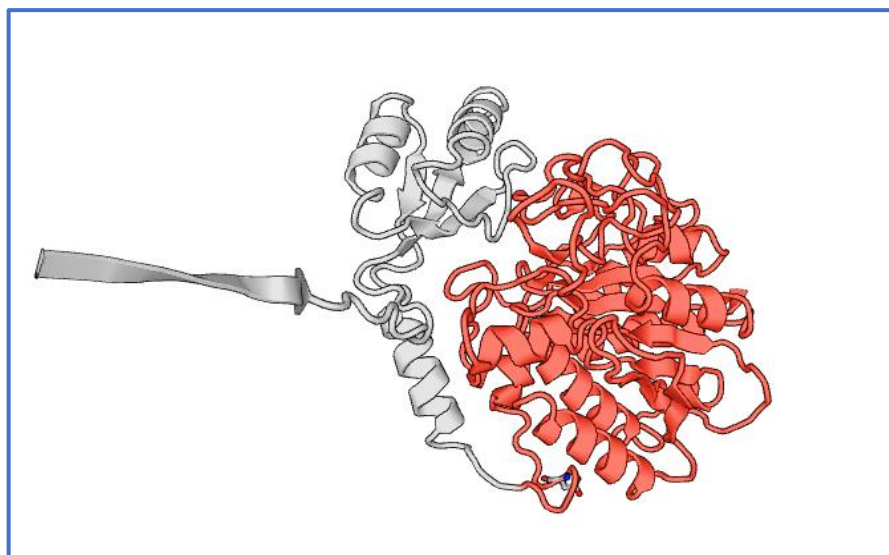
[123]. Aktywacja proCPA1 do CPA1 jest katalizowana przez rozszczepienie proteolityczne na C-końcu. Po działaniu trypsynogenu proCPA1 jest drugim największym komponentem soku trzustkowego i stanowi około 16% wszystkich białek.

Gen kodujący karboksypeptydazę A1 zlokalizowany jest na chromosomie 7 (7q32.2) w klastrze wraz z genami kodującymi inne metaloproteazy trzustkowe -CPA2, oraz te których ekspresja odbywa się w innych tkankach (CPA4, CPA5). Lokalizację i ułożenie w klastrze przedstawiono na rycinie poniżej (Ryc. 2).



Ryc. 2 Ułożenie genu *CPA1* w klastrze. *CPA4* – ekspresja w skórze, *CPA5* – ekspresja w jądrach [źródło: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1357>] Data dostępu 06.04.2022.

Gen *CPA1* jest kodowany przez 7776 nukleotydów, składa się z 10 egzonów. W wyniku transkrypcji powstaje mRNA kodowane przez 1389 nukleotydy. Kolejny etap to translacja, w którym powstaje białko składające się z 419 aminokwasów o masie 47140 Da. Niedojrzałe białko składa się z części sygnałowej, którą stanowi 16 aminokwasów, części propeptydu aminokwasy 17-110, oraz części funkcjonalnej enzymu (aminokwasy od 111 do 416). Kluczową rolę w zapobieganiu samotrąwienia organu odgrywa propeptyd, utrzymujący enzym w formie nieaktywnej. Poniżej przedstawiono model struktury proKarboksypeptydazy (Ryc. 3).

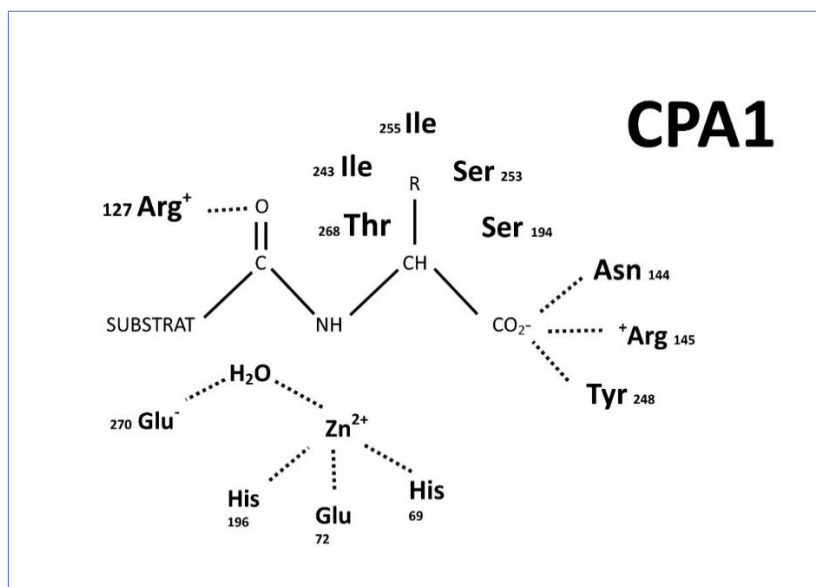


Ryc. 3 Model struktury enzymu ProKarboksypeptydazy. Szara część proenzymu – aminokwasy 1 – 110, czerwona część proenzymu – część aktywna enzymu, aminokwasy 111 – 419. (Źródło:<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P15085?model=AF-P15085-F1-model-v2>).

Kofaktorem dla białka są jony cynku ( $Zn^{2+}$ ). Miejsca wiązania cynku zlokalizowane są w pozycjach His<sup>69</sup>, Glu<sup>72</sup> i His<sup>196</sup>, miejsca wiązania substratu i miejsca katalityczne w pozycjach Arg<sup>71</sup>, Arg<sup>124</sup>, Arg<sup>127</sup>, Lys<sup>128</sup>, Asn<sup>144</sup>, Arg<sup>145</sup>, Ser<sup>194</sup>, Ser<sup>197</sup>, Tyr<sup>198</sup>, Ser<sup>199</sup>, Ile<sup>243</sup>, Tyr<sup>248</sup>, Ser<sup>253</sup>, Ile<sup>255</sup>, Thr<sup>268</sup>, Glu<sup>270</sup> i Phe<sup>279</sup> [124]. Poniżej (Ryc. 4) przedstawiono schemat wiązania substratu oraz lokalizację aminokwasów biorących udział w reakcji enzymatycznej.

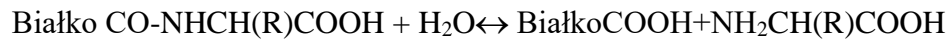
hCPA1 NP_001859.1	1	M R G L L V L S V L	L G A V F G K E D F	V G H Q V L R I S V
hCPA1 NP_001859.1	31	A D E A Q V Q K V K	E L E D L E H L Q L	D F W R G P A H P G
hCPA1 NP_001859.1	61	S P I D V R V P F P	S I Q A V K I F L E	S H G I S Y E T M I
hCPA1 NP_001859.1	91	E D V Q S L L D E E	Q E Q M F A F R S R	A R S T D T F N Y A
hCPA1 NP_001859.1	121	T Y H T L E E I Y D	F L D L L V A E N P	H L V S K I Q I G N
hCPA1 NP_001859.1	151	T Y E G R P I Y V L	K F S T G G S K R P	A I W I D T G I H S
hCPA1 NP_001859.1	181	R E W V T Q A S G V	W F A K K I T Q D Y	G Q D A A F T A I L
hCPA1 NP_001859.1	211	D T L D I F L E I V	T N P D G F A F T H	S T N R M W R K T R
hCPA1 NP_001859.1	241	S H T A G S L C I G	V D P N R N W D A G	F G L S G A S S N P
hCPA1 NP_001859.1	271	C S E T Y H G K F A	N S E V E V K S I V	D F V K D H G N I K
hCPA1 NP_001859.1	301	A F I S I H S Y S Q	L L M Y P Y G Y K T	E P V P D Q D E L D
hCPA1 NP_001859.1	331	Q L S K A A V T A L	A S L Y G T K N F Y	G S I I K A I Y Q A
hCPA1 NP_001859.1	361	S G S T I D W T Y S	Q G I K Y S F T F E	L R D T G R Y G F L
hCPA1 NP_001859.1	391	L P A S Q I I P T A	K E T W L A L L T I	M E H T L N H P Y

Ryc. 4 Lokalizacja miejsc zaangażowanych w wiązanie substratu z uwzględnieniem pozycji na sekwencji referencyjnej NP\_001859.1 (Opracowanie własne na podstawie [124]).



Ryc. 5. Schemat wiązania substratu przez aktywny enzym CPA1 z uwzględnieniem reszt aminokwasowych zaangażowanych w ten proces (numeracja aminokwasów wg. NP\_001859.1(111-419)) (Opracowanie własne na podstawie [124,125]).

Karboksypeptydaza A, której aktywność obserwowana jest w jelicie, katalizuje hydrolizę C-końcowych aminokwasów w białkach i pokrewnych estrach:



Preferowane substraty (aminokwasy) to aminokwasy z pierścieniem aromatycznym np. fenyloalanina, tryptofan i tyrozyna. Karboksypeptydaza tnie C-terminalne aminokwasy lub wiązania estrowe, szczególnie te z wolnymi C-terminalnymi grupami karboksylowymi.

### 1.11 Uzasadnienie wyboru tematu badawczego

Znajomość wpływu czynnika genetycznego ma niezwykle istotne znaczenie w przypadku wielu chorób, przede wszystkim nowotworowych. W miarę postępu technologicznego mającego wpływ na rozwój technik biologii molekularnej oraz coraz większej dostępności do badań genetycznych możliwe jest zaobserwowanie nowych zależności pomiędzy mutacjami, a ryzykiem wystąpienia danej choroby. Stałe powiększanie grup badanych oraz dokonywanie metaanaliz z już dostępnych badań, umożliwia zwiększenie pewności statystycznej i wyodrębnienie swoistych markerów choroby.

Do tej pory określono kilka mutacji predysponujących do wystąpienia ostrego zapalenia trzustki, jednak żaden nie jest stosowany jako standardowy marker genetyczny. Według danych literaturowych najbardziej prawdopodobny mechanizm powstawania zapalenia trzustki wynika z powstałego stresu siateczki śródplazmatycznej wywołanego błędną syntezą białka. W nawiązaniu do tych obserwacji, w niniejszej pracy poddano analizie zmienność sekwencji genu karboksypeptydazy, enzymu który występuje najobficiej w soku trzustkowym. W literaturze niewiele jest doniesień na temat mutacji w genie *CPAI* i ich roli w powstawaniu ostrego zapalenia trzustki oraz powikłań po OZT. Dodatkowo, przeprowadzono analizę współwystępowania mutacji w jednym genie w korelacji z OZT, co stanowi istotny nowatorski aspekt przeprowadzonych badań. Najistotniejszym efektem naukowym przeprowadzonych badań jest dostarczenie nowych danych dotyczących zmienności genetycznej w grupie pacjentów z OZT jak również określenie potencjalnych czynników genetycznych predysponujących do powstania zapalenia oraz powikłań po OZT.

## 2. Cele pracy

Głównym celem pracy jest ocena zmienności sekwencji genu *CPAI* u chorych na ostre zapalenie trzustki, oraz analiza zależności pomiędzy wyselekcjonowanymi mutacjami, a ryzykiem wystąpienia OZT o zróżnicowanej etiologii.

Cele szczegółowe:

1. Identyfikacja mutacji genetycznych oraz rejonów o najwyższej zmienności w egzonach 5, 6, 8, 9 oraz intronach sąsiadujących.
2. Analiza częstości występowania mutacji w grupie OZT w porównaniu do osób zdrowych z uwzględnieniem czynnika etiologicznego zapalenia trzustki.
3. Określenie zależności pomiędzy zmiennością genu *CPAI*, etiologią, a ryzykiem nawrotu choroby oraz jej powikłań.

### 3. Materiały i metody

Przedmiot badań stanowił materiał biologiczny w postaci krwi pozyskanej od osób wyselekcjonowanych do badania. Materiał zmagazynowano w laboratorium Katedry Medycyny Zabiegowej z Pracownią Genetyki Medycznej Collegium Medicum UJK. Dane osób badanych przechowywane są w bazie danych Pracowni Genetyki Medycznej CM, UJK pochodzące od 320 pacjentów chorujących na zapalenie trzustki oraz 184 osób zdrowych zaklasyfikowanych jako grupa kontrolna. Dane kliniczne pacjentów z OZT obejmowały: etiologię zapalenia, wywiad rodzinny, informację na temat nawrotu choroby oraz ciężkości zapalenia. Materiał do badań pobrano od pacjentów w latach 2013-2020. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 2).

Tab. 2 Charakterystyka grupy badanej.

	Średni wiek (zakres) [lata]	Mediana (Q1, Q3)	liczba mężczyzn n (%)	liczba kobiet n (%)
OZT [n=301]	54,5 (18-97)	54.0 (41.0, 68.0)	174 (57,8%)	127 (42,2%)
Kontrola [n=184]	51,2 (31-90)	49.0 (41.0, 58.2)	75 (40,8%)	109 (59,2%)

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Wydziale Lekarskim i Nauk o Zdrowiu (obecnie Collegium Medicum), Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach (Uchwała nr 48/2018 z dn.18.09.2018).

Kryteria ogólne włączenia do badania:

1. Pełne dane kliniczne na temat stanu zdrowia osoby badanej.
2. Materiał biologiczny zmagazynowany w postaci zamrożonej krwi obwodowej, bez oznak hemolizy, z której wyizolowane DNA spełniało wymagania jakościowe i ilościowe do przeprowadzenia sekwencjonowania. Minimalne stężenie DNA wynosiło 10 ng/ $\mu$ l

Kryteria włączenia do poszczególnych grup:

1. Grupa badana OZT: pacjenci powyżej 18 roku życia, ze stwierdzonym ostrym zapaleniem trzustki, o określonej etiologii zapalenia.
2. Grupa kontrolna: osoby zdrowe powyżej 18 roku życia, bez stwierdzonych chorób trzustki. Dane określone na podstawie bazy danych CM UJK.

Kryterium wyłączenia:

Wyłączeniu z grupy badanej podlegali pacjenci, których:

1. dane dotyczące stanu zdrowia były niepełne,
2. materiał zmagazynowany nie spełniał warunków pozwalających na przeprowadzenie analizy genetycznej,
3. ilość materiału genetycznego po izolacji była niewystarczająca,
4. jakość uzyskanych chromatogramów sekwencjonowania była niewystarczająca do prawidłowej interpretacji sekwencji nukleotydów.

Etiologię zapalenia trzustki podzielono na 6 kategorii: alkoholową, żółciopochodną, idiopatyczną, polekową, hipertriglicydemię oraz OZT w okresie połogu. Dane zebrane w wywiadzie rodzinnym dotyczyły wystąpienia chorób trzustki ogółem (cukrzycy, zapalenia trzustki, raka trzustki). Dane skategoryzowano w zależności od poziomu pokrewieństwa i zakodowano według schematu:

- brak chorób w rodzinie,
- choroba u matki lub ojca,
- chore rodzeństwo,
- choroba u dziadka lub babci,
- chory syn lub córka,
- dalsza rodzina.

### **3.1 Przechowywanie materiału biologicznego**

Do izolacji materiału genetycznego wykorzystano krew zmagazynowaną w laboratorium Collegium Medicum, UJK. Krew pochodziła od pacjentów chorych na ostre zapalenie trzustki i osób z grupy kontrolnej, od których pozyskano materiał w latach 2013 – 2020. Krew była przechowywana w kontrolowanych warunkach temperaturowych -80°C.

### **3.2 Izolacja materiału genetycznego**

Do badań wykorzystano kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) wyizolowany przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji DNA z krwi obwodowej Genomic Micro AX Blood Gravity (A&A Biotechnology, Gdańsk). Przed przystąpieniem do izolacji należało rozmrozić krew oraz dokładnie wymieszać próbki w celu homogenizacji materiału wejściowego. Pierwszy etap izolacji opierał się na lizie komórek krwi w 50 °C z użyciem

enzymu Proteinazy K w buforze zabezpieczającym przed degradacją DNA (bufor LSU). Kolejny etap to adsorpcja DNA na membranach kolumny stanowiącej część zestawu. Metoda opierała się na przepływie grawitacyjnym. Po upływie określonego czasu DNA poddawano dwukrotnie płukaniu odpowiednimi buforami (W1G, W2). Ostatnim etapem izolacji była elucja roztworem wodnym do zamykanych szczelnie probówek. Materiał był przechowywany w temperaturze 4 °C.

### 3.3 Kontrola jakości materiału

Wyizolowane DNA poddano analizie metodą spektrofotometryczną przy użyciu urządzenia umożliwiającego pomiar w kropli (DeNovix Ds-11, DeNovix Inc., Wilmington, USA). Sprawdzano absorbancję dla długości fali 230 nm, 260 nm, 280 nm. Następnie na podstawie stosunku wartości otrzymanych pomiarów dla poszczególnych długości fal: 260/280, 260/230 określano czystość oraz ilość wyizolowanego DNA. Normy dla pomiarów przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 3).

Tab. 3 Normy dla pomiaru DNA metodą spektrofotometryczną [126].

Wskaźnik	Norma	Prawdopodobne zanieczyszczenie
260/280	$\geq 1,8$	Wartości poniżej normy wskazują na zanieczyszczenie białkami.
260/230	$\geq 1,8$	Wartości poniżej normy wskazują na zanieczyszczenie związkami absorbującymi przy długości fali 230 nm (EDTA, polisacharydy, etanol)

Minimalne stężenie DNA wymagane dla prowadzonych badań wynosiło 10 ng/ $\mu$ l

Próbki, dla których powyższe kryteria nie były spełnione poddawano ponownej izolacji.

### 3.4 Amplifikacja fragmentów DNA

W celu amplifikacji wybranych fragmentów genu karboksypeptydazy A1 przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej mieszaniny reakcyjnej DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™). Protokół do przygotowania mieszaniny przedstawiono poniżej (Tab. 4).

Tab. 4 Skład mieszaniny reakcyjnej – objętość na jedną reakcję.

Odczynnik	Objętość na jedną reakcję [ $\mu$ l]
Green PCR Master Mix	12,5
Starter F (10 ppm)	0,5
Starter R (10 ppm)	0,5
H <sub>2</sub> O	9,5
Matryca DNA	2
Razem	25

Do reakcji użyto starterów zsyntezowanych w oparciu o dane dostępne w publikacji Witt H. i wsp. [56]. Sekwencje starterów oraz długość powstałego produktu przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 5).

Tab. 5 Sekwencje starterów użytych do reakcji amplifikacji, wielkość powstałego produktu.

	Sekwencja	Produkt
Egzon 5-6	5'-GCCCCACAAGCAGAGCCTCT-'3	650 pz
	5'-AGACACCCTCGGCTAGGAGC-'3	
Egzon 7-9	5'-CCGACAACCAGCTGGGAGTG-'3	1704 pz
	5'-CAGATCTGGGTGCCCTTGGC-'3	

Zoptymalizowane warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 6.

Tab. 6 Zoptymalizowane warunki reakcji amplifikacji.

Etap	Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja	95	3 min	1
Denaturacja	95	20 sek	35
Hybrydyzacja starterów	62	40 sek	
Elongacja	72	2 min	
Elongacja	72	6 min	1

Zamplifikowane fragmenty DNA przechowywano w temperaturze 4 $^{\circ}$ C aż do momentu sekwencjonowania jednak nie dłużej niż 48 godzin.

### 3.5 Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA zostało wykonane przez firmę Macrogen (Amsterdam Holandia). Próbki transportowano do miejsca docelowego w temperaturze 4-8°C, gdzie poddawano je wstępnemu oczyszczaniu i ponownej amplifikacji ze starterem do sekwencjonowania. Sekwencje starterów podano w tabeli poniżej (Tab. 7).

Tab. 7 Sekwencje starterów wykorzystanych do sekwencjonowania [56].

Reakcja	Sekwencja startera
Egzon 5-6	5'-GCCCCACAAGCAGAGCCTCT-3'
Egzon 8-9	5'-CAGATCTGGGTGCCCTTGGC-3'

### 3.6 Analiza jakościowa chromatogramów

Chromatogramy poddano wstępnej weryfikacji. Przyjęto kryteria zaproponowane przez ACGS (Association for Clinical Genetic Science) [127]. Chromatogramy oceniano pod względem symetrycznego rozłożenia pików fluorescencji oraz wysokości tła w stosunku do właściwych odczytów. Przyjęto, że chromatogram może być poddany dalszej analizie, jeśli środki pików fluorescencji rozłożone są symetrycznie, a średnia wysokość pików tła nie przekracza 5% wysokości właściwych odczytów fluorescencji. Do analizy użyto oprogramowania FinchTV 1.4.0 for Windows (Geospiza). Przeprowadzono także ocenę jakości chromatogramów na podstawie intensywności odczytu dla całej długości sekwencji. Przyjęto, że wartość szumu dla całej sekwencji nie może przekraczać 5% wartości intensywności odczytów głównych. Określono wartości QV (ang. *quality value*). Przyjęto, że dla pojedynczego odczytu wartości muszą mieścić się w zakresie QV= 20-50, dla odczytów mieszanych (jak w przypadku heterozygot) QV=10-50. Następnie analizowano wartość długości ciągłego odczytu (CRL, ang. *contiguous read length*). Założone wartości CRL dla prowadzonych analiz były różne w zależności od amplifikowanego fragmentu. Dla analizy fragmentu pokrywającego sekwencje egzonów 5-6 przyjęto CRL większe niż 500, dla analizy fragmentu pokrywającego egzony 7-9 przyjęto CRL większe niż 960. Ocenę wartości QC, CRL przeprowadzono z użyciem oprogramowania Quality check (Thermo Fisher Scientific) dostępnego na stronie (<https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/apps>)

### 3.7 Analiza sekwencji

Sekwencje porównywano do sekwencji referencyjnej dla genu karboksypeptydazy A1 dostępnej w bazie NCBI (ang. The National Center for Biotechnology Information). Międzynarodowy numer sekwencji OMIM: 114850; NG\_042276.1. Porównania sekwencji do sekwencji referencyjnych dokonano przy użyciu oprogramowania Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI, USA). Określono zmiany homo- i heterozygotyczne oraz ustalono lokalizację zmian na podstawie sekwencji referencyjnej. Lokalizację opisywano w odniesieniu do sekwencji genomowej stosując oznaczenie „g.” a następnie pozycję nukleotydu. Substytucje nukleotydowe oznaczano według ogólnie panującej nomenklatury stosując znak „>”, insercje „ins” oraz delecje „del”. Dla zmian zlokalizowanych w egzonach dodatkowo określano wpływ mutacji na powstające białko. Wszystkie mutacje sprawdzano w międzynarodowej bazie ClinVar (NCBI) oraz Varsome Clinical w celu sprawdzenia numerów referencyjnych (RefSNP, rs)

### 3.8 Analiza statystyczna

W opisie statystycznym cech ilościowych zastosowano średnie arytmetyczne, mediany oraz zakresy wartości (minimum i maksimum). Rozkłady danych jakościowych opisywano za pomocą częstości i procentów. Częstości porównywano za pomocą testu chi-kwadrat lub dokładnego testu Fishera. Normalność rozkładów cech ilościowych sprawdzano testem Shapiro-Wilka. Z powodu naruszenia założenia o normalności, rozkłady cech ilościowych porównywano za pomocą testu U Mann’a-Whitney’a. Określono iloraz szans (ang. *odds ratio*, OR) oraz relatywne ryzyko (ang. *relative risk*, RR).

Wszystkie przeprowadzone testy statystyczne były dwustronne. Jako kryterium istotności statystycznej przyjęto  $p < 0.05$ . W obliczeniach wykorzystano program R, wersja 3.6.2 R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Analiza statystyczna wykonana w konsultacji z dr Magdaleną Chrapek, Katedra Matematyki, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, UJK.

## 4. Wyniki

### 4.1 Ogólna charakterystyka badanej grupy

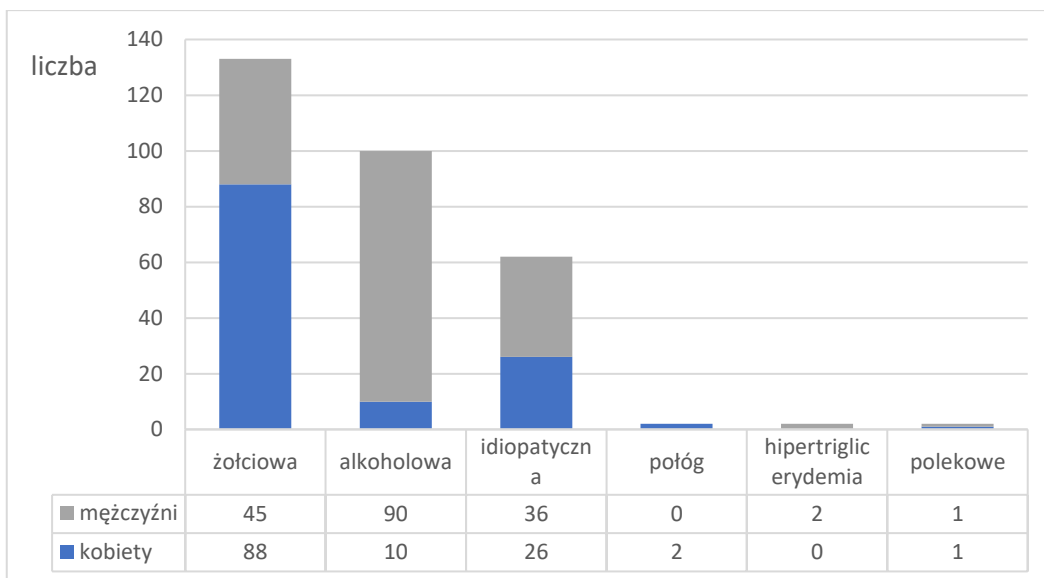
Materiał badany stanowiły próbki krwi przechowywane w laboratorium Collegium Medicum UJK. Spośród 1463 próbek (stan na 20.02.2020) wyselekcjonowano do badania 400 próbek pacjentów z pierwotnie zdiagnozowanym OZT oraz 200 próbek należących do grupy kontrolnej. Selekcję próbek przeprowadzono losowo z uwzględnieniem kryteriów włączenia i wyłączenia. Na etapie izolacji materiału genetycznego odrzucono 36 próbek, dla których jakość materiału nie spełniała kryteriów przyjętych w procesie badawczym. Kolejne 10 próbek odrzucono w pierwszym etapie analizy, reakcji amplifikacji fragmentów metodą PCR. Próbki odrzucono ze względu na brak powstałego produktu w którejkolwiek reakcji PCR. (amplifikującej region egzonów 5-6 i 7-9). Etap sekwencjonowania wykluczył 50 próbek dla których jakość chromatogramów nie spełniała założonych wymagań jakościowych, zgodnych z ogólnie przyjętymi zasadami sekwencjonowania. Wyniki analizy genetycznej spełniające wymagania uzyskano dla 504 próbek. Po weryfikacji dokumentacji medycznej wśród chorych wyodrębniono grupę PZT liczącą 19 przypadków. Grupa została wyłączona z badania.

Finalnie charakterystyka demograficzna grup badanych wyglądała następująco:

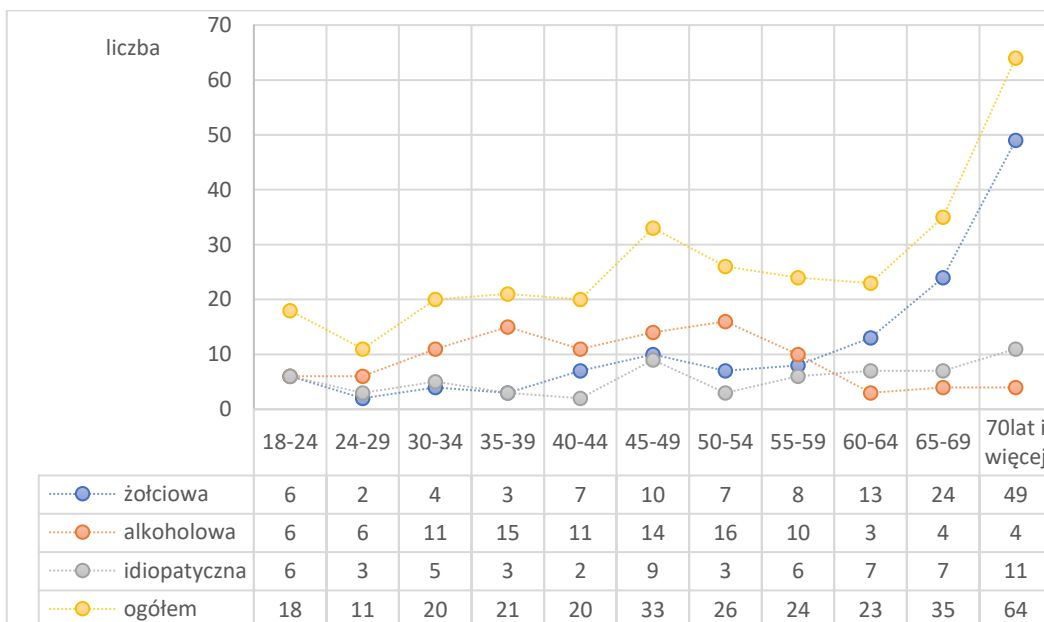
- Grupa chorych na OZT liczyła 301 osób w tym 174 mężczyzn i 127 kobiet w wieku od 18 do 97 lat,
- Grupa kontrolna składała się z 184 osób w tym 75 mężczyzn i 109 kobiet w wieku od 31 do 90 lat.

#### 4.1.1 Etiologia zapalenia

Najczęstszym czynnikiem etiologicznym OZT była kamica żółciowa, drugim najczęstszym czynnikiem było nadmierne spożywanie alkoholu. Zidentyfikowano nieliczne przypadki OZT rozwijającego się w wyniku hipertriglicydemii o etiologii polekowej oraz w okresie połogu. Dla 62 pacjentów przyczynę zapalenia określono jako idiopatyczną. Rozkład czynnika w grupie kobiet i mężczyzn oraz z uwzględnieniem wieku przedstawiono poniżej (Ryc. 6, Ryc. 7).



Ryc. 6 Udział czynnika etiologicznego OZT z podziałem na płeć.



Ryc. 7 Podział na grupy wiekowe z uwzględnieniem czynnika etiologicznego OZT.

#### 4.1.2 Nawrotowość

Nawrotowość choroby została określona dla 268 pacjentów, dla 33 pacjentów brak było pełnych danych klinicznych. Nawrót choroby obserwowano w 149 (55,6%) przypadkach, brak nawrotu w 119 (44,4%) przypadkach. Skorelowano nawrotowość choroby z etiologią zapalenia. Istotność statystyczną określono porównując liczebność grupy pacjentów o konkretnej etiologii w porównaniu do pozostałych grup (suma). Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 8).

Tab. 8 Zależność pomiędzy etiologią OZT a nawrotami choroby, test statystyczny: dokładny test Fishera.

Etiologia (n)	Nawrót n (%)	Brak nawrotu n (%)	Brak danych n (%)	p
Idiopatyczna (62)	22 (35,5%)	13 (21,0%)	27 (43,5%)	Ns
Żółciowa (133)	63 (47,4%)	68 (51,1%)	2 (1,5%)	Ns
<b>Alkoholowa (100)</b>	<b>62 (62,0%)</b>	<b>34 (34,0%)</b>	<b>4 (4,0%)</b>	<b>0,0297</b>
Połów (2)	0	2 (100%)	0	Ns
Hipertriglicydemia (2)	0	2 (100%)	0	Ns
Polekowe (2)	2 (100%)	0	0	Ns

n – liczba; Ns – brak istotności statystycznej

Stwierdzono, że nawroty zdarzały się statystycznie istotnie częściej w grupie OZT o etiologii alkoholowej.

#### 4.1.3 Obciążenie wywiadem rodzinnym

Dane dotyczące wywiadu rodzinnego zebrano u 258/301 pacjentów z OZT. Dla grupy kontrolnej brak było danych. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 9).

Tab. 9 Rozkład obciążenia rodzinnego dla OZT ogółem oraz z podziałem na czynnik etiologiczny, test statystyczny: Chi-kwadrat.

	Brak chorób w rodzinie	Matka lub ojciec	Rodzeństwo	Babcia lub dziadek	Syn lub córka	Dalsza rodzina	Brak danych	p
<b>OZT ogółem</b>	<b>221</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>43</b>	
Alkoholowe	80	6	5	-	-	-		0,952
Żółciopochodne	114	8	4	2	1	1		
Idiopatyczne	22	7	-	-	1	-		

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy etiologią, obciążeniem rodzinnym a ryzykiem wystąpienia OZT.

#### 4.1.4 Przebieg zapalenia

Oceny przebiegu zapalenia dokonano na podstawie dokumentacji medycznej, stosując wytyczne klasyfikacji z Atlanty. W tabeli poniżej przedstawiono charakterystykę badanej grupy uwzględniając przebieg i etiologię zapalenia (Tab.10).

Tab. 10 Rozkład ciężkości zapalenia dla OZT ogółem oraz z podziałem na czynnik etiologiczny.

Przebieg OZT	łagodny	umiarkowany	ciężki
<b>OZT ogółem (n=301)</b>	<b>211[70,1%]</b>	<b>15[5,0%]</b>	<b>75[24,9%]</b>
Alkoholowe (n=100)	61 [61%]	5 [5%]	34 [34%]
Żółciopochodne (n=133)	104[78%]	3[2%]	26 [20%]
Idiopatyczne (n=62)	40[65%]	7[11%]	15 [24%]
Inne (n=6)	6 [100%]	0	0

OZT o przebiegu łagodnym diagnozowano najczęściej bez względu na etiologię zapalenia.

#### 4.2 Analiza ogólna mutacji zidentyfikowanych w badanym materiale

Na podstawie przeprowadzonych analiz chromatogramów zidentyfikowano 196 mutacji pojedynczych nukleotydów zlokalizowanych zarówno w intronach jak i w egzonach. Sumarycznie w sekwencjach intronów zidentyfikowano 112 mutacji, a w sekwencjach kodujących 84 mutacje. Szczegółowy rozkład mutacji przedstawiono poniżej (Tab. 11).

Tab. 11 Rozkład mutacji w poszczególnych intronach i egzonach, lokalizacja na podstawie sekwencji referencyjnej NG\_042276.1.

Lokalizacja	Liczba mutacji ogółem	Liczba mutacji typu missense
Intron [g.7977 – g. 8018]	27 [13,8%]	0
<b>Egzon 5 [g.8019-g. 8122]</b>	<b>20 [10,2%]</b>	<b>19</b>
Intron [g.8123-g.8300]	19 [9,7%]	0
<b>Egzon 6 [g.8312-g.8424]</b>	<b>28 [14,3%]</b>	<b>25</b>
Intron [g.8425-g.8475]	12 [6,12%]	0
Intron [g.9701-9775]	5 [2,6%]	0
<b>Egzon 8 [g. 9776-9976]</b>	<b>33 [16,8%]</b>	<b>32</b>
Intron [g. 9977-g.10467]	32 [16,3%]	0
<b>Egzon 9 [g.10468-10553]</b>	<b>3 [1,5%]</b>	<b>0</b>
Intron [g. 10554-g.10654]	17 [17,7%]	0

Najwięcej mutacji zlokalizowano w egzonie 8 oraz w intronie sąsiadującym, łącznie 65 mutacji (33,1%).

W kolejnym etapie analizy mutacje zakwalifikowano do trzech grup: insercje (n=15), delecje (n=30) oraz substytucje (n=151). Dodatkowo mutacje zlokalizowane w egzonach przeanalizowano pod kątem konsekwencji w procesie ekspresji białka. Zidentyfikowano 76 mutacji typu zmiany sensu (ang. *missense*), 6 mutacji niemających wpływu na powstające białko (mutacje ciche, ang. *silent*), 2 mutacje zmieniających ramkę odczytu (ang. *frameshift*). Zidentyfikowano jedną mutację zlokalizowaną w miejscu wycinania intronów (ang. *splicingowym*).

W przypadku 98,98% (193/196) mutacji obserwowano występowanie wyłącznie heterozygot. W przypadku trzech mutacji zidentyfikowano homozygoty. Mutacja c.696+27del zidentyfikowana u 7/184 kontroli i 11/301 OZT, mutacja p.Ala208Thr zidentyfikowana u 1/301 OZT oraz mutacja c.696+28insA zidentyfikowana u 2/301 pacjentów z OZT.

### **4.3 Analiza częstości występowania mutacji w poszczególnych grupach**

Częstość mutacji analizowano z podziałem na dwie grupy badawcze: pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki i osoby zdrowe (grupa kontrolna). W tabeli poniżej przedstawiono 10 najczęściej identyfikowanych mutacji w grupie kontrolnej oraz u chorych na OZT (Tab. 12).

Tab. 12 Dziesięć najczęściej identyfikowanych mutacji u chorych na OZT i w grupie kontrolnej.

Egzon/intron	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji	Liczba wystąpień (% [w odniesieniu do liczebności danej grupy])		Liczba wystąpień ogółem
					Kontrola (n=184)	OZT (n=301)	
Intron	g. 8451	[c.696+27del]; [c.696+27=]	-	rs34925618	<b>62</b> (33.7%)	92 (30.56%)	154
Intron	g. 10157	[c.987+182G>C, T]; [c.987+182=]	-	rs2284682	27 (14.67%)	<b>53</b> (17.61%)	80
6	g.8328	[c.600C>T];[c.600=]	p.Tyr200=	rs12706927	33 (17.93%)	<b>42</b> (13.95%)	75
Intron	g.10032	[c.987+57G>A]; [c.987+57G=]	-	-	10 (5.43%)	<b>39</b> (12.96%)	49
6	g.8350	[c.622G>A]; [c.622=]	p.Ala208Thr	rs34474469	<b>21</b> (11.41%)	20 (6.64%)	41
6	g.8353	[c.625A>T];[c.625=]	p. Ile209Phe	rs782417364	<b>25</b> (13.59%)	16 (5.32%)	41
6	g.8359	[c. 631G>A]; [c.631=]	p.Asp211Asn	-	14 (7.61%)	<b>23</b> (7.64%)	37
Intron	g.10035	[c.987+60T>A,C]; [c.987+60=]	-	-	8 (4.35%)	<b>20</b> (6.64%)	28
Intron	g.8451	[c.696+27del]; [c.696+27del]	-	rs34925618	7 (3.8%)	<b>11</b> (3.65%)	18
Intron	g.10629	[c.1072+76del]; [c.1072+76=]	-	-	2 (1.09%)	<b>12</b> (3.99%)	14

Zidentyfikowano mutacje zlokalizowane w egzonach mające wpływ na strukturę białka (mutacje typu *missense*) – częstość występowania tych mutacji wynosiła od 1 do 3 przypadków w grupach, jednak nie stwierdzono istotności statystycznej (dokładny test Fishera). Listę mutacji przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 13).

Tab. 13 Mutacje zmieniające strukturę białka, mutacje egzonowe zidentyfikowane w grupie chorych na OZT i w grupie kontrolnej .

OZT (n)		Kontrole (n)	
p.Gly166Asp(1);	p.Asn222Ser(1);	p.Ile178Val(1);	<b>p.Asp291Asn(2);</b>
p.Ser167Gly(1);	p.Asp224Asn(1);	p.Ala187Pro (1);	p.Val293Gly(1);
p.Ala171Thr(1);	p.Gly225Asp(2);	<b>p.Tyr200=(1);</b>	p.Asp295Glu(1);
p.Asp175Val (1);	<b>p.Thr232Arg(2);</b>	<b>p. Gly201Arg(2);</b>	p.His296Tyr(1);
p.Gly177Val(1);	<b>p.Ser268Lys(1);</b>	p.Thr212Ser(1);	p.Ile299Val(1);
p. Trp183Ser(1);	<b>p.Asp291Asn(1);</b>	<b>p.Asp214Asn(3);</b>	<b>p.Lys300Arg(2);</b>
p. Phe192Ile(1);	p.His296Val(1);	<b>p.Thr232Arg(2);</b>	p.Ala301Gly(1);
p.Gln198His(1);	p.Lys300Gly(1);	p.Ser264Cys(1);	p.Ile305Phe(1);
<b>p.Tyr200=(1);</b>	<b>p.Lys300Arg(1);</b>	p.Ser267Thr(1);	p.Ser307Gly(1);
<b>p. Gly201Arg(2);</b>	p.Ile305Ser(1);	p.Ser267Arg(1);	p.Phe309Leu(3);
p.Asp203Glu(3);	p.Tyr308Asn(1);	<b>p.Ser268Lys(2);</b>	p.Leu311Pro(1);
<b>p. Asp214Asn(1);</b>	p.Gln310His(1)	p.Cys271Gly(1);	p.Met313Arg(3);
p. Phe216Ser(2);		p.Cys271Trp(2);	p.Met313Lys(1);
p.Leu217Gln(1);		p.Glu283Lys(1);	p.Glu328Lys(1);
p.Val220Ile(1);		p.Lys287Glu(1);	

n- liczba przypadków w badanej grupie, **pogrubienie**- mutacje występujące w więcej niż jednej grupie.

Kolejny etap analizy obejmował porównanie częstości występowania mutacji w grupie OZT w stosunku do grupy kontrolnej. W sumie zidentyfikowano 187 mutacji, z czego 120 mutacji (120/187; 64,17%) wystąpiło tylko u 1 pacjenta z OZT lub kontroli ( $p=0,3794$ ). Zidentyfikowano 58 (58/187;31,02%) mutacji występujących więcej niż u jednej badanej osoby z danej grupy, lecz częstość tego występowania nie była istotna statystycznie (Test Fishera,  $p>0.05$ ). Różnica bliska istotności statystycznej (tendencja statystyczna) była obserwowana w przypadku 7 mutacji. Dane przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 14).

Tab. 14 Mutacje, dla których wykazano tendencję częstszego występowania w danej grupie badanej (OZT lub kontrolnej), test statystyczny: dokładny test Fishera,  $0,05 < p < 0,1$ .

Egzon	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji	Liczba wystąpień (% [w odniesieniu do liczebności danej grupy])		<i>p</i>
					Kontrola (n=184)	OZT (n=301)	
Intron	g.7987	[c.484-34del]; [c.484-34=]	-	-	3 (1.6%)	0 (0.0%)	0,0541
6	g.8350	[c.622G>A]; [c.622=]	p.Ala208Thr	rs34474469	21 (11.4%)	20 (6.6%)	0,067
8	g.9913	[c.925T>C]; [c.925=]	p.Ser309Pro	-	3 (1.6%)	0 (0.0%)	0,0541
8	g.9926	[c.938T>G]; [c.938=]	p.Met313Arg	-	3 (1.6%)	0 (0.0%)	0,0541
Intron	g.10073	[c.987+98A>T,G,C]; [c.987=]	-	-	8 (4.3%)	4 (1.3%)	0,0657
Intron	g.10629	[c.1072+76del]; [c.1072=]	-	-	2 (1.1%)	12 (4.0%)	0,0642
Intron	g.10652	[c.1072+99del]; [c.1072=]	-	-	4 (2.2%)	1 (0.3%)	0,0711

Statystycznie istotną różnicę występowania mutacji w danej grupie zidentyfikowano dla 4 przypadków, była to jedna mutacja zmieniająca sekwencję aminokwasową (p.Ile209Phe) oraz trzy mutacje zlokalizowane na intronach (c.987+57G>A, c.1072+84del, c.1072+94del). Dodatkowo analizowano częstość występowania mutacji w regionach o dużym zagęszczeniu mutacji. Określono iloraz szans (OR) oraz relatywne ryzyko (RR). Zaobserwowano, że w regionie od c.484-33 do c.585+46G mutacje występowały statystycznie istotnie częściej w grupie OZT ( $p < 0,01$ ). Co zwiększało ryzyko wystąpienia OZT 5 krotnie. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 15).

Tab.15 Częstość występowania mutacji w grupie chorych na OZT oraz w grupie kontrolnej, dla których wykazano istotność statystyczną, test statystyczny: dokładny test Fishera); OR - iloraz szans; RR - relatywne ryzyko.

Egzon/ Intron	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji	Liczba wystąpień (% [w odniesieniu do liczebności danej grupy])		p	OR [95%CI]	RR [95% CI]
					Kontrola (n=184)	OZT (n=301)			
Egzon 6	g.8353	[c. 625A>T]; [c.625=]	p. Ile209Phe	rs782417364	25 (13.6%)	16 (5.3%)	*	0,36 [0,19;0,69]	0,39 [0,22;0,72]
Intron	g.10032	[c.987+57G>A]; [c.987=]	-	-	10 (5.4%)	39 (13.0%)	**	2,59 [1,26;5,32]	2,38 [1,22;4,66]
Intron	g.10637	[c.1072+84del]; [c.1072+84=]	-	-	0 (0.0%)	7 (2.3%)	*	ns	ns
Intron	g.10647	[c.1072+94del]; [c.1072+94=]	-	-	9 (4.9%)	4 (1.3%)	*	0,26 [0,08-0,87]	0,27 [0,08-0,09]
Intron/5/Intron	g.7988-8170	c.484-33; c.585+48	-	-	3 (1.6%)	22 (7.3%)	**	4,75 [1,4;16,13]	4,48 [1,36;14,77]

\*p=0.05-0.011; \*\*p <0.01, ns- nie szacowano, ze względu na brak przypadków w grupie kontrolnej.

W przypadku mutacji *missense*, dla której zidentyfikowano homozygoty przeanalizowano częstość genotypów oraz alleli w grupie OZT i grupie kontrolnej. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 16).

Tab.16 Częstość występowania genotypów oraz alleli w grupie kontrolnej i u chorych na OZT. Metoda statystyczna: dokładny test Fishera.

		Kontrola n=184	OZT n=301	p
c.622G>A [p.Ala208Thr]	G/G	163	280	G/G vs. G/A+A/A p>0,05
	G/A	21	20	
	A/A	0	1	G/G + G/A vs. A/A p>0,05
	G	347	580	p>0,05
	A	21	22	

Nie zaobserwowano istotności statystycznej w przypadku rozkładu genotypów oraz częstości występowania alleli w grupie OZT o kontrolnej.

#### 4.4 Podział ze względu na etiologię zapalenia

Zidentyfikowano 11 mutacji występujących tylko w grupie z OZT o podłożu nieokreślonym, 32 mutacji charakterystycznych dla grupy z OZT alkoholowym i 32 mutacji charakterystycznych dla OZT o etiologii żółciowej. Mutacje występowały tylko w pojedynczych przypadkach. Listę mutacji przedstawiono poniżej (Tab. 17-19).

Tab.17 Lista mutacji unikalnych dla OZT o podłożu idiopatycznym.

Egzon/Intron	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji
Intron	g.7978	[c.484-43del];[c.484-43del]	-	-
Intron	g.7984	[c.484-37G>T];[c.484-37=]	-	-
Egzon 5	g.8032	[c.465G>C];[c.465=]	p.Gly165=	-
Intron	g.8133	[c.585+11G>A];[c.585+11=]	-	rs1183786457
Intron	g.8203	[c.585+81 G>A];[c.585+81=]	-	-
Intron	g.8205	[c.585+83C>A];[c.585+83=]	-	-
Intron	g.8300	[c.586-14C>A];[c.586-14=]	-	-
Intron	g.8313	[c.586-1G>A];[c.586-1=]	-	-
Intron	g.8430	[c.696+6G>C];[c.696+6=]	-	-
Intron	g.10133	[c.987+157del];[c.987+157del]	-	-
Intron	g.10212	[c.987+237G>A];[c.987+23=]	-	rs782368236

Tab. 18 Lista mutacji unikalnych dla OZT o podłożu alkoholowym.

Egzon/Intron	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji
Intron	g.7977	[c.484-44ins];[c.484-44ins]	-	-
Intron	g.7980	[c.484-41C>T];[c.484-41=]	-	-
Intron	g.7984	[c.484-37del];[c.484-37del]	-	-
Intron	g.7989	[c.484-332ins];[c.484-332ins]	-	-
Intron	g.7991	[c.484-30del];[c.484-30del]	-	-
Intron	g.7993	[c.484-28T>G];[c.484-28=]	-	-
Intron	g.8003	[c.484-18C>T];[ c.484-18=]	-	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8021</b>	<b>[c.484T&gt;A];[c.484=]</b>	<b>p.Phe162Leu</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8034</b>	<b>[c.497G&gt;A];[c.497=]</b>	<b>p.Gly166Asp</b>	<b>rs144546424</b>
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8036</b>	<b>[c.500A&gt;G]; [c.500=]</b>	<b>p.Ser167Gly</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8048</b>	<b>[c.511 G&gt;A]; [c.511=]</b>	<b>p.Ala171Thr</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8062</b>	<b>[c.524A&gt;T]; [c.524=]</b>	<b>p.Asp175Val</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8067</b>	<b>[c.530G&gt;T];[c.530=]</b>	<b>p.Gly177Val</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8085</b>	<b>[c.548G&gt;C];[c.548=]</b>	<b>p.Trp183Ser</b>	<b>rs781963872</b>
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8111</b>	<b>[c.614A&gt;T];[c.614=]</b>	<b>p.Phe192Ile</b>	-
<b>Egzon 5</b>	<b>g.8122</b>	<b>[c.585G&gt;A];[c.585=]</b>	<b>p.Lys195=</b>	-
Intron	g.8227	[c.586-87G>T];[c.586-87=]	-	-
Intron	g.8263	[c.586-51G>C];[c.856-51=]	-	rs1204967110
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8350</b>	<b>[c.622G&gt;A];[c.622G&gt;A]</b>	<b>p.Ala208Thr</b>	<b>rs34474469</b>
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8379</b>	<b>[c.651G&gt;C];[c.651=]</b>	<b>p.Leu217=</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8397</b>	<b>[c.669T&gt;G];[c.669=]</b>	<b>p.Pro223=</b>	-
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9780</b>	<b>[c.792C&gt;G];[c.792=]</b>	<b>p.Ser264=</b>	<b>rs782313134</b>
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9886</b>	<b>[c.898A&gt;G];[c.898=]</b>	<b>p.Lys300Gly</b>	-
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9918</b>	<b>[c.930G&gt;C];[c.930=]</b>	<b>p.Gln310His</b>	-
Intron	g.10055	[c.987+80T>G];[ c.987+80=]	-	-
Intron	g.10080	[c.987+105C>G];[c.987+105=]	-	-
Intron	g.10268	[c.988-201G>C];[c.988-201=]	-	rs544590173
Intron	g.10623	[c.1072+68del];[c.1072+68del]	-	-
Intron	g.10624	[c.1072+69del];[c.1072+69del]	-	-
Intron	g.10627	[c.1072+76del];[c.1072+76del]	-	-
Intron	g.10637	[c.1072+84A>G];[c.1072+84=]	-	-
Intron	g.10641	[c.1072+88ins];[c.1072+88ins]	-	-

Tab. 19 Lista mutacji charakterystycznych dla OZT o podłożu żółciowym.

Egzon/Intron	Lokalizacja NG_042276.1	Genotyp	Zmiana aminokwasu	Numer referencyjny mutacji
Intron	g.7992	[c.484-29C>T];[c.484-29=]	-	-
Intron	g.8003	[c.484-18del];[c.484-18del]	-	-
Intron	g.8146	[c.585+24G>A];[c.585+24=]	-	rs782805275
Intron	g.8158	[c.585+36A>T];[c.585+36=]	-	-
Intron	g.8202	[c.585+80 G>A];[c.585+80=]	-	-
Intron	g.8209	[c.585+87C>T];[c.585+87=]	-	-
Intron	g.8264	[c.586-49A>C];[c.586-49=]	-	-
Intron	g.8565	[c.696+142C>A];[c.696+142=]	-	-
Intron	g.8268	[c.586-46A>C];[c.586-46=]	-	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8316</b>	<b>[c.588C&gt;A];[c.588=]</b>	<b>p.Ile196=</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8322</b>	<b>[c.594 A&gt;T];[c.594=]</b>	<b>p.Gln198His</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8327</b>	<b>[c.599_600delA CinsG];[c.599_600=]</b>	<b>p.Tyr200TrpfsTer91</b>	<b>rs1584851947</b>
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8337</b>	<b>[c.609 T&gt;G];[c.609=]</b>	<b>p.Asp203Glu</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8375</b>	<b>[c.647T&gt;C];[c.647=]</b>	<b>p.Phe216Ser</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8378</b>	<b>[c.650T&gt;A];[c.650=]</b>	<b>p.Leu217Gln</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8386</b>	<b>[c.658G&gt;A];[c.658=]</b>	<b>p.Val220Ile</b>	<b>rs1554411595</b>
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8393</b>	<b>[c.665A&gt;G];[c.665=]</b>	<b>p.Asn222Ser</b>	-
<b>Egzon 6</b>	<b>g.8398</b>	<b>[c.670G&gt;A];[c.670=]</b>	<b>p.Asp224Asn</b>	-
Intron	g.8454	[c.696+30G>C];[c.696+30=]	-	-
Intron	g.8456	[c.696+32A>G];[c.696+32=]	-	-
Intron	g.8457	[c.696+33G>A];[c.696+33=]	-	-
Intron	g.8460	[c.696+36del];[c.696+36del]	-	-
Intron	g.8467	[c.696+43C>T];[c.696+43=]	-	rs1247840160
Intron	g.8473	[c.696+49T>C];[c.696+49=]	-	-
Intron	g.8475	[c.696+51T>A];[c.696+51=]	-	-
Intron	g.9764	[c.788-12G>C];[c.788-12=]	-	-
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9786</b>	<b>[c.798C&gt;G];[c.798=]</b>	<b>p.Ala266=</b>	-
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9902</b>	<b>[c.914 T&gt;G];[c.914=]</b>	<b>p.Ile305Ser</b>	-
<b>Egzon 8</b>	<b>g.9910</b>	<b>[c.922 T&gt;A];[c.922=]</b>	<b>p.Tyr308Asn</b>	-
Intron	g.10589	[c.1072+36G>A];[c.1072+36=]	-	rs180749875
Intron	g.10650	[c.1072+97del];[c.1072+97del]	-	-
Intron	g.7985	[c.484-36del];[c.484-36del]	-	-

#### 4.4.1 Nawrotowość zapalenia

Zidentyfikowano 148 mutacji unikalnych dla pacjentów z nawrotami oraz 120 mutacji charakterystycznych dla pacjentów, u których nie stwierdzono nawrotu choroby. Stwierdzono brak istotności statystycznej dla jakiejkolwiek mutacji.

W przypadku mutacji *missense* p.Ala208Thr określono rozkład genotypów oraz częstość alleli. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 20).

Tab. 20 Rozkład genotypów oraz częstość alleli w grupach pacjentów, u których zaobserwowano nawrót oraz u pacjentów bez nawrotu, test statystyczny: dokładny test Fishera.

		Nawrót n=149	Brak nawrotu n=119	<i>p</i>
c.622G>A [p.Ala208Thr]	G/G	141	109	G/G vs. G/A+A/A <i>p</i> >0,05
	G/A	7	10	
	A/A	1	0	G/G + G/A vs. A/A <i>p</i> >0,05
	G	289	228	<i>p</i> >0,05
	A	9	10	

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic. W przypadku jednej mutacji intronowej c.987+98A>T stwierdzono tendencję statystyczną (Dokładny test Fishera *p*=0,0885), występującą u 8 kontroli oraz 4 pacjentów chorych na OZT o różnej etiologii.

#### 4.4.2 Mutacje a przebieg zapalenia

W przypadku mutacji typu *missense*, dla której zidentyfikowano występowanie homozygot przeanalizowano zależność pomiędzy genotypami a przebiegiem choroby. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 21).

Tab. 21 Rozkład genotypów i alleli w grupach chorych na OZT w zależności od przebiegu choroby, test statystyczny: dokładny test Fishera.

		Łagodny n=211	Umiarkowany n=15	Ciężki n=75	<i>p</i>
c.622G>A [p.Ala208Thr]	G/G	195	15	70	G/G vs. G/A+A/A <i>p</i> >0,05
	G/A	15	0	5	G/G + G/A vs. A/A <i>p</i> >0,05
	A/A	1	0	0	
	G	405	30	145	<i>p</i> >0,05
	A	17	0	5	

Nie zaobserwowano istotności statystycznej w przypadku częstości występowania genotypów oraz alleli.

Mutacja c.484-35A>G (rs1296496489) występowała wyłącznie u 3/75 pacjentów z OZT o ciężkim przebiegu podczas gdy nie zaobserwowano mutacji u pacjentów chorych na OZT o przebiegu łagodnym lub umiarkowanym (0/223) (Dokładny test Fishera, *p*=0,017). Dodatkowo mutacja nie była identyfikowana u żadnej osoby zdrowej (0/184). Ze względu na brak przypadków w pozostałych grupach nie określono wpływu mutacji na ryzyko względne (RR) oraz iloraz szans (OR). Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 22).

Tab. 22 Występowanie mutacji w grupie chorych na OZT w korelacji z przebiegiem zapalenia, test statystyczny: dokładny test Fishera.

	przebieg OZT			<i>p</i>
	Łagodny	Umiarkowany	Ciężki	
<b>Brak mutacji</b> n=282	211	15	72	0,015
<b>c.484-35A&gt;G</b> n=3	0	0	3	

#### 4.5 Współwystępowanie mutacji

Podczas analizy współwystępowania mutacji w poszczególnych grupach zidentyfikowano 155 konfiguracji, w których ilość mutacji wahała się od 2 do 11. Najczęściej stwierdzanymi konfiguracjami były:

- c.625A>T[p.Ile209Phe]/c.631G>A [p.Asp211Asn] zidentyfikowana w 5 przypadkach w grupie kontrolnej i 10 przypadkach grupy OZT,
- c.622G>A[p.Ala208Thr]/c.696+27delG zidentyfikowana u 5 przypadkach w grupie kontrolnej i 6 przypadkach grupy OZT,
- c.987+57G>A/c.987+60T>A 4 kontrole i 7 OZT,
- c.600C>T[p.Tyr200=]/ c.696+27del 2 kontrole, 7 OZT,
- c.631G>A[p.Asp211Asn]/ c.696+27del 4 kontrole 3 OZT,
- c.625A>T[p.Ile209Phe]/ c.696+27del 4 kontrole i 3 OZT,
- c.696+27del/ c.987+182G>C, 2 kontrole, 3 OZT,
- c.600C>T[p.Tyr200=]/ c.622G>A[p.Ala208Thr]/ c.696+27del, 4 kontrole i 1 OZT,
- c.600C>T[p.Tyr200=]/c.625A>T[p. Ile209Phe] - 5 kontroli.

Określono 50 konfiguracji występujących tylko w grupie kontrolnej, 86 konfiguracji tylko w grupie z OZT.

Analizując współwystępowanie mutacji o charakterze protekcyjnym p.Ile209Phe oraz mutacji p.Asp211Asn określono, że szansa wystąpienia choroby w grupie nosicieli mutacji protekcyjnej jest siedmiokrotnie wyższa w przypadku współwystępowania mutacji p.Asp211Asn. Na rycinie poniżej (Ryc. 8) przedstawiono zależność pomiędzy parą analizowanych mutacji.

<b>p.Ile209Phe</b>			<b>p.Asp211Asn</b>		
Kontrola n=184	<b>25</b>	<i>p-val</i> <0,05	Kontrola n=184	<b>14</b>	<i>p-val</i> >0,05
OZT n=301	<b>16</b>		OZT n=301	<b>23</b>	

<b>p.Ile209Phe/p.Asp211Asn</b>			
Kontrola n=25	<b>5</b> Średni wiek = 48 lat	<i>p-val</i> <0,05	<b>OR=6,667</b> 95%CI (1,62-27,27)
OZT n=16	<b>10</b> Średni wiek =55 lat		

Ryc. 8 Zależność pomiędzy współwystępowaniem mutacji protekcyjnej p.Ile209Phe oraz p.Asp211Asn, test statystyczny: dokładny test Fishera, OR- iloraz szans.

#### 4.6 Mutacje genetyczne a powikłania miejscowe

Określono, że współwystępowanie mutacji c.987+57G>A i c.987+60T>A,C zdarzało się statystycznie istotnie częściej u pacjentów chorych na OZT u których zdiagnozowano torbiele trzustki (test Fishera  $p=0,007$ ). Współwystępowanie mutacji zwiększało ryzyko wystąpienia torbieli pięciokrotnie wśród pacjentów chorych na OZT. Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 23).

Tab. 23 Zależność pomiędzy współwystępowaniem mutacji a ryzykiem wystąpienia torbieli, test statystyczny: dokładny test Fishera, OR- iloraz szans, RR- ryzyko względne.

OZT	Brak torbieli	torbiel	<i>p</i>	
<b>Brak mutacji n=282</b>	267	15	0.0049	OR=6,357 [95% CI 2,02- 19,99]
<b>c.987+57G&gt;A/ c.987+60T&gt;A,C n=19</b>	14	5		RR=4,94 [95% CI 2,01- 12,16]

#### 4.7 Mutacje genetyczne w kontekście obciążenia wywiadem rodzinnym

Dodatni wywiad rodzinny wykazano dla 35 chorych. Nie wykazano zależności. W przypadku mutacji p.Ala208Thr określono rozkład genotypów oraz alleli. Wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 24).

Tab. 24 Rozkład genotypów i alleli w grupie chorych na OZT w zależności od obciążenia rodzinnego, test statystyczny: dokładny test Fishera.

		Brak obciążenia wywiadem rodzinnym n=221	Dodatni wywiad rodzinny n=35	<i>p</i>
c.622G>A [p.Ala208Thr]	G/G	203	35	G/G vs. G/A+A/A <i>p</i> >0,05
	G/A	17	0	G/G + G/A vs. A/A <i>p</i> >0,05
	A/A	1	0	
	G	423	70	<i>p</i> >0,05
	A	19	0	

#### 4.8 Podsumowanie wyników badań

1. W grupie badanej OZT było identyfikowane częściej u mężczyzn niż u kobiet, u mężczyzn przeważało OZT o etiologii alkoholowej, a u kobiet o etiologii żółciowej.
2. Rozkład czynnika etiologicznego w grupach wiekowych wskazuje, że OZT alkoholowe dominuje w grupie wiekowej 30-60 lat, natomiast powyżej OZT żółciopochodne.
3. Zaobserwowano, że etiologia alkoholowa zwiększa szansę nawrotu dwukrotnie (OR=1,85,  $p<0,05$ ).
4. Najwięcej mutacji zaobserwowano w rejonie egzonu 8 i intronów sąsiadujących, a najczęściej identyfikowany typ mutacji to substytucje.
5. W przypadku siedmiu mutacji zaobserwowano trend statystyczny przy czym sześć wskazywałoby na charakter protekcyjny (c.484-34del, p.Ala208Thr, p.Ser309Pro, p.Met313Arg, c.987+98A>T,G,C, c.1072+99del), a jedna na mutację zwiększającą ryzyko OZT (c.1072+76del).
6. Zidentyfikowano dwie mutacje występujące statystycznie istotnie częściej u chorych na OZT (c.1072+84del, c.987+57G>A).
7. Mutacje regionu c.484-33 do c.585+48 (obejmujący egzon 5), występowały statystycznie istotnie częściej w grupie OZT, zwiększając ryzyko choroby pięciokrotnie ( $p<0.01$ ).
8. Wystąpienie mutacji c.484-35A>G zwiększało ryzyko wystąpienia OZT o przebiegu ciężkim ( $p<0.05$ ).
9. Współwystępowanie mutacji c.987+57G>A/c.987+60T>A,C pięciokrotnie zwiększało ryzyko wystąpienia torbieli u chorych na OZT ( $p<0.05$ ).
10. Dwie mutacje występowały statystycznie częściej u osób zdrowych niż u chorych na OZT ogółem, co wskazuje na ich charakter protekcyjny (p.Ile209Phe, c.1072+94del).
11. Szansa wystąpienia choroby w grupie nosicieli mutacji protekcyjnej jest siedmiokrotnie wyższa w przypadku współwystępowania mutacji p.Asp211Asn.

## 5. Dyskusja

Ostre zapalenie trzustki diagnozowane jest od ponad 400 lat [1], a w miarę rozwoju technik badawczych możliwe staje się określenie patomechanizmu powstawania OZT. Należy jednak podkreślić, że bardzo często ryzyko wystąpienia większości chorób zwiększa się wraz z wiekiem oraz współwystępującymi czynnikami środowiskowymi. Od 1953 roku, gdy po raz pierwszy opisano strukturę DNA, w świecie medycyny nastąpiła rewolucja. Kolejnym kamieniem milowym w diagnostyce molekularnej było opracowanie metod sekwencjonowania w latach 70 XX wieku [128]. Od tamtej pory masowo zaczęto analizować podłoże genetyczne wielu chorób i z sukcesem opracowywać markery genetyczne predysponujące do wystąpienia wielu z nich. Wśród najbardziej znanych i najlepiej opisanych chorób monogenowych można wyróżnić mukowiscydozę spowodowaną mutacjami genu *CFTR*, dystrofię mięśniową Duchenna spowodowaną mutacjami w genie *DMD*, ataksje Friedreicha zależną od mutacji w genie kodującym frataksynę (*FXN*), hemofilię wywołaną mutacjami w genach *F8* i *F9* odpowiedzialnych za kodowanie czynników krzepnięcia krwi, rdzeniowy zanik mięśni (ang. *Spinal muscular atrophy*, SMA) związany z mutacjami genu *SMN1*. Lista chorób, dla których określono podłoże genetyczne stale się powiększa, a badania genetyczne są wprowadzane do standardowej diagnostyki przesiewowej na przykład diagnostyki przesiewowej noworodków [129]. Opisano również mutacje genetyczne określone jako marker zwiększający ryzyko wystąpienia chorób, w szczególności chorób nowotworowych, a ich wystąpienie wiąże się z wprowadzeniem konkretnych procedur medycznych. Najbardziej znane – mutacje w genie *BRCA1* i *BRCA2*, które zwiększają ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet o około 55-72% w przypadku mutacji *BRCA1* i 45-69% w przypadku mutacji w *BRCA2*. Wczesna identyfikacja mutacji pozwala na wdrożenie profilaktyki choroby [130,131].

Prowadzona analiza miała na celu zbadanie zmienności sekwencji genu *CPAI* u chorych na ostre zapalenie trzustki diagnozowanych w latach 2013-2020 na terenie województwa świętokrzyskiego oraz wykazanie, czy istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy wykrytymi mutacjami, a ryzykiem wystąpienia choroby, czynnikami etiologicznymi, przebiegiem, nawrotowością zapalenia oraz powikłaniami.

## **Klasyfikacja czynników etiologicznych w ostrym zapaleniu trzustki**

Podobnie jak w przypadku wielu chorób, tak w ostrym zapaleniu trzustki najważniejszą rolę odgrywa styl życia, wiek, choroby współistniejące oraz czynniki środowiskowe [20]. Wyniki badań opublikowane w 2017 roku przez Robertsa i wsp. [6] określające częstość występowania i etiologię ostrego zapalenia trzustki w Europie jednoznacznie pokazują, że w Europie zachodniej (Włochy, Grecja, Turcja, Hiszpania, Portugalia i Chorwacja) dominuje OZT żółciopochodne diagnozowane nawet 10 razy częściej niż OZT alkoholowe. Zupełnie przeciwne wyniki uzyskano dla Europy wschodniej, gdzie dominuje OZT o podłożu alkoholowym. Analizy dokonano na podstawie danych epidemiologicznych z 51 krajów, w tym danych z województwa świętokrzyskiego opublikowanych przez Głuszka S. i wsp. w 2012 roku [16]. Materiał wykorzystany w niniejszej pracy pochodził od pacjentów diagnozowanych i leczonych w województwie świętokrzyskim. W grupie badanej stosunek OZT żółciopochodnego do OZT alkoholowego wynosił 1:1. Wpływ na taki rozkład czynnika etiologicznego, mógł mieć dobór grupy badanej, gdzie pobranie materiału do badań wiązało się z wyrażeniem pisemnej zgody przez pacjentów. Mimo to potwierdzono, że kamica żółciowa oraz spożywanie nadmiernej ilości alkoholu są najczęściej diagnozowanym czynnikiem etiologicznym OZT.

W metaanalizie z 2022 roku opublikowanej przez Iannuzzi J.P i wsp. [132] wykazano, że globalnie OZT dotyka w tym samym stopniu kobiety i mężczyzn. Badania prowadzone na populacji polskiej przez Fabisiaka i wsp. [133] wskazują statystycznie istotną różnicę pomiędzy mężczyznami, a kobietami. Badania prowadzone na populacji województwa świętokrzyskiego przez Głuszka i wsp. [16] potwierdzają, że płeć męska predysponuje do wystąpienia OZT. W niniejszej pracy w grupie badanej również zaobserwowano dominację mężczyzn, którzy stanowili 57,8 % w grupie z OZT. Jak podkreślono w rozdziale pierwszym niniejszej pracy, widoczna jest zależność pomiędzy czynnikiem etiologicznym, a płcią. U kobiet OZT żółciopochodne diagnozowane jest częściej, natomiast u mężczyzn dominuje OZT alkoholowe [20]. Taką samą tendencję zaobserwowano w grupie badanej, gdzie OZT żółciopochodne stwierdzono dwa razy częściej u kobiet, a OZT alkoholowe dziewięć razy częściej u mężczyzn.

W badaniach opublikowanych przez Roberts'a i wsp. [6] widoczny jest nagły wzrost zachorowalności po 60 roku życia. Korelacja wieku chorych z czynnikiem etiologicznym

wskazuje, że szczyt zachorowalności dla OZT alkoholowego znajduje się pomiędzy 35-45 r. ż (15-30/100 000 mieszkańców), natomiast etiologia żółciopochodna charakterystyczna jest dla populacji po 60 r. ż. (25-60 / 100 000 mieszkańców). W niniejszej pracy również zaobserwowano, że OZT o podłożu żółciowym stanowiło 73% (86/122) zachorowań po 60 r. ż. W przypadku OZT o podłożu alkoholowym ilość przypadków była podobna we wszystkich grupach wiekowych.

Ostre zapalenie trzustki, może być również spowodowane efektami ubocznymi zastosowanych leków (OZT polekowe) do 1993 zidentyfikowano ponad 525 leków mogących wywołać OZT. W obecnie starzejącym się społeczeństwie etiologia polekowa może być niedoszacowana oraz może w przyszłości stać się jednym z głównych przyczyn uszkodzeń trzustki oraz występowania OZT [47,48]. W grupie badanej zidentyfikowano tylko dwa przypadki OZT polekowego.

### **Mutacje genetyczne i ich rola w mechanizmie powstawania zapalenia**

Mutacje opisane w dostępnych bazach danych powiązane z ryzykiem zachorowania na ostre zapalenie trzustki indukują zapalenie na drodze różnych mechanizmów. Jedną z pierwszych prac, w których poruszono problem podłoża genetycznego zapalenia trzustki była praca z Whitcomba i wsp. opublikowana w 1996 roku [71]. W pracy po raz pierwszy opisano mutację w genie *PRSSI* zlokalizowaną w pozycji p.Arg117His skorelowaną z dziedzicznym zapaleniem trzustki. W późniejszych latach zidentyfikowano kolejne mutacje, które szczegółowo opisano we wstępie do niniejszej pracy. W następstwie podjęto badania nad genami zaangażowanymi w regulację aktywności enzymów trzustkowych. Obserwuje się wysoką częstość występowania mutacji w genie *PRRS1* u dzieci (44 %) i tylko w 2 % u osób dorosłych hospitalizowanych z powodu zapalenia trzustki [134]. Mechanizm występowania zapalenia, w przypadku mutacji w *PRRS1* opiera się na wzmożonej konwersji trypsynogenu do trypsyny, co w konsekwencji powoduje przedwczesną aktywację enzymów trzustkowych [135]. Równie dobrze opisane mutacje w genie *CFTR*, które nie warunkowały wystąpienia mukowiscydozy wpływały na występowanie przewlekłego zapalenia trzustki. Mechanizm powstawania zapalenia trzustki w tym przypadku polega na zaburzeniu wydzielania jonów  $\text{HCO}_3^-$ , powstawaniu kwaśnego soku trzustkowego ( $\text{pH} < 6.5$ ), który zwiększa lepkość śluzu i zmniejsza rozpuszczalność wydzielanych enzymów trzustkowych. Oba te czynniki predysponują do tworzenia czopów mucynowo-

białkowych, a ostatecznie cyst w obrębie drzewa przewodowego. Zaburzenia w pH soku trzustkowego mogą również prowadzić do przedwczesnej aktywacji enzymów i samotrawienia organu [67]. Częstość występowania tych mutacji Miller i wsp. [136] oraz Schwarzenberg i wsp. [134] oszacowali na 28 % u dzieci i 15 % u dorosłych. W tej samej pracy Schwarzenberg i wsp. ocenili, że mutacje w *SPINK1* występują u 23 % dzieci i 7 % dorosłych z OZT, a ich występowanie zwiększa ryzyko przejścia choroby w stan przewlekły. Mechanizm powstawania zapalenia związany z mutacjami w *SPINK1* opiera się na zaburzeniu równowagi pomiędzy proteazą i inhibitorem proteazy, w konsekwencji komórka traci pierwszą linię obrony przeciwko przedwczesnej aktywacji tripsynogenu. Mutacje występujące rzadziej takie jak *CTRC* c.180C>T (<1%) miały znaczenie w przypadku jednoczesnego wystąpienia mutacji w *SPINK1* i/lub *CFTR* [134]. Muddana i wsp. [137] określili, że mutacje w *CASR* (<1%) podwyższyły ryzyko wystąpienia OZT u osób ze współistniejącymi mutacjami w genach *PRSSI*, *SPINK1* lub *CFTR*. Mechanizm powstawania zapalenia w przypadku mutacji w *CTRC* związany jest ze zmniejszoną sekrecją chymotrypsyny C, przez co komórka traci drugą linię obrony przeciwko przedwczesnej aktywacji tripsynogenu [54].

Mechanizm powstawania zapalenia związany z mutacjami w genach kodujących enzymy trzustkowe, może być związany z powstawaniem źle sfałdowanego białka i wystąpieniem stresu siateczki śródplazmatycznej. Celem pracy była charakterystyka zmienności genu karboksypeptydazy u chorych na ostre zapalenie trzustki a w efekcie zidentyfikowano dwie mutacje *CPAI*, które występowały statystycznie istotnie częściej w grupie z OZT. Mutacje są zlokalizowane w sekwencji niekodującej, a w oparciu o analizę międzynarodowych baz danych (NCBI, ClinVar) stwierdzono, że mutacje nie były wcześniej raportowane. Oszacowano, że mutacja *CPAI* c.987+57G>A dwukrotnie zwiększała ryzyko zachorowania na OZT [RR = 2,38 [95%CI 1,22;4,66]. W przypadku delekcji c.1072+94del nie określono ryzyka względnego, ponieważ mutacja była identyfikowana jedynie w grupie z OZT. Porównując lokalizację zidentyfikowanych mutacji do danych literaturowych ustalono, że Witt i wsp. nie odnotowali występowania mutacji *CPAI* c.987+57G>A i c.1072+94del jednak zidentyfikowali mutację w bliskim sąsiedztwie c.987+58G>A u jednej kontroli [56]. Należy zaznaczyć, że badania Witta i wsp. [56] były prowadzone na większej lecz bardziej zróżnicowanej populacji (Niemcy, Francja, Czechy Polska, Indie i Japonia). Można więc przypuszczać, że częstość występowania tej mutacji jest zależna od szerokości geograficznej. W badaniach

prowadzonych na populacji Chińskiej przez Wu H. i wsp.[138] nie zidentyfikowano żadnej mutacji, wykrytych w niniejszych badaniach. Jak wspomniano we wstępie, mutacje nie zawsze mogą predysponować do wystąpienia choroby.

Mutacje o charakterze protekcyjnym zidentyfikowano również w niniejszych badaniach, mutację typu *missense* (p.Ile209Phe) oraz mutację zlokalizowaną w intronie (c.1072+94del). W bazie danych NCBI opisano mutację w tej samej lokalizacji (rs782417364), co wariant p.Ile209Phe, jednak zmiana dotyczy tranzycji c.625A>G, p.Ile209Val, nie określono wpływu mutacji na ryzyko wystąpienia OZT. W prowadzonych badaniach w tej samej lokalizacji zidentyfikowano mutację p.Ile209Leu występującą tylko u 1 kontroli. Delecja c.1072+94del zidentyfikowana w obszarze intronu również nie była wcześniej raportowana. W literaturze brak jest wzmianek na temat patogenności któregośkolwiek z identyfikowanych wariantów.

Mutacje o charakterze protekcyjnym w stosunku do zapaleń trzustki były również opisywane przez innych autorów. Przykładowo Witt i wsp. [79] opisali mutację p.G191R *PRSS2*, która występowała statystycznie częściej u osób zdrowych ( $p=0,000012$ ). Jednak częstość występowania ogółem nie przekraczała 5%. Mechanizm protekcyjny opierał się na natychmiastowej autodegradacji anionowego tripsynogenu co chroniło nosicieli mutacji przed wystąpieniem PZT [79].

Analizując dziesięć najczęściej występujących mutacji w badanej populacji – jedna p.Ala208Thr była wcześniej opisana przez Witta i wsp. [56]. Częstość występowania tej mutacji w grupie Europejczyków z OZT nie była istotna statystycznie, jednak występowała u 7,5 % (45/600) chorych na OZT i 5,9 % (143/2432) osób zdrowych. W populacji badanej częstość występowania tej mutacji u chorych była podobna i wynosiła 6,6 % (20/301) i w 11 % (21/184) osób z grupy kontrolnej, co nie było istotne statystycznie. W przypadku tej samej mutacji określono rozkład genotypów oraz alleli, jednak nie stwierdzono istotności statystycznej. W badaniach prowadzonych przez Wu i wsp. [138] na populacji Chińskiej mutacja ta była zidentyfikowana tylko u jednego pacjenta z PZT i jednej osoby zdrowej. Można więc przypuszczać, że częstość występowania tych mutacji jest zależna od szerokości geograficznej.

W tych samych badaniach, prowadzonych przez Wu i wsp. [138] raportowano występowanie mutacji p.Gly225Asp u jednego pacjenta z PZT. W niniejszej pracy w grupie badanej mutacja ta występowała równie rzadko i została zidentyfikowana

u jednego pacjenta z OZT. W badaniach prowadzonych przez Witta i wsp. [56] zidentyfikowano mutację p.Gly166Asp u jednego chorego i 11 kontroli, różnica ta nie była istotna statystycznie. Mutacja była również identyfikowana w niniejszych badaniach jednak występowała tylko u jednego chorego na OZT. Witt i wsp.[56] zidentyfikowali mutację p.Tyr308His, która występowała statystycznie istotnie częściej u chorych na PZT o podłożu niealkoholowym ( $p=0,02$ ). W niniejszych badaniach w tej samej lokalizacji identyfikowano mutację p.Tyr308Asn, występowała ona u jednego pacjenta z OZT żółciopochodnym.

Analizując *in silico* wszystkie zidentyfikowane mutacje pod względem zaangażowania w syntezę białka, 58 z nich ma wpływ na sekwencję aminokwasową powstającego białka CPA1, a każda z nich może zaburzać aktywność enzymu lub powodować zmianę struktury białka. W celu potwierdzenia, należy przeprowadzić badania badające poziom ekspresji białka, jak również jego aktywności. Jednoznaczna ocena wpływu mutacji na wystąpienie choroby, jest możliwa poprzez badania na modelu zwierzęcym. Jak opisano we wstępie niniejszej rozprawy mutacje powodujące zmianę sekwencji aminokwasowej mogą powodować akumulację źle sfałdowanego białka, a w konsekwencji indukować wystąpienie ERS. Nagromadzenie błędnie zsyntezowanej karboksypeptydazy może aktywować odpowiedź zapalną w trzustce. W 2019 roku Hegyi E. i Sahin-Toth M.[82] badali *in vivo* wpływ mutacji CPA1 p.Asn256Lys na ryzyko wystąpienia PZT u myszy. Były to pierwsze badania na modelu mysim pozwalające określić wpływ źle sfałdowanego białka karboksypeptydazy na ryzyko PZT oraz potwierdzające możliwość powstania zapalenia na drodze ERS. W badaniach opublikowanych przez Hegyi E. i Sahin-Toth M. jednoznacznie wykazano, że myszy będące nosicielami mutacji CPA1 p.Asn256Lys wykształcały przewlekłe zapalenie trzustki, a poziom uszkodzenia tkanek rósł w czasie i tak po trzech miesiącach tkanka trzustki była uszkodzona już w 15 %, po 6 miesiącach uszkodzenie obejmowało 20 % tkanek, natomiast po roku uszkodzeniu ulegało około 30 % tkanki trzustki, co świadczy o wysokim potencjale mutacji genu CPA1 jako czynnika zwiększającego ryzyko zachorowania na przewlekłe zapalenie trzustki. Model myszy jednoznacznie wskazuje na znaczny udział mutacji w procesie powstawania zapalenia, a przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania potwierdzają zależność pomiędzy występowaniem mutacji w genie CPA1 a ryzykiem wystąpienia również ostrej postaci choroby.

## **Regiony genu o najwyższej zmienności - znaczenie w ryzyku wystąpienia OZT**

Analizując całościowo sekwencje genów wyróżnia się regiony, w których zagęszczenie mutacji jest wyższe w porównaniu do całości genu. I tak na przykład Rosendahl i wsp. [63], Szmola i wsp.[139] oraz Kozieł i wsp.[140] określili, że wystąpienie mutacji w egzonach 3 i 7 *CTRC* zwiększało ryzyko wystąpienia zapaleń OZT i PZT.

Z tego względu w przeprowadzonych badaniach również podjęto próbę identyfikacji obszaru w genie karboksypeptydazy, na terenie którego wystąpienie jakiegokolwiek mutacji zwiększałoby ryzyko wystąpienia OZT. Określono, że obszar obejmujący egzon 5 oraz część intronów sąsiadujących (c.484-33; c.585+48) jest obszarem o wysokim potencjale mutagennym. Zaobserwowano, że wystąpienie mutacji w tym obszarze pięciokrotnie zwiększa ryzyko zachorowania na OZT, pomimo, że najwięcej mutacji typu *missense* zidentyfikowano w egzonie 8 (32 mutacje), a następnie w egzonie 6 (25 mutacji). Porównując otrzymane wyniki do danych literaturowych, Witt i wsp. [56] zaobserwowali, że najwięcej mutacji wpływających na sekrecję i aktywność enzymu CPA1 występowało rejonie egzonu 7, 8 i 10. Jak opisano we wstępie w egzonie 5, 7, 8, 9 i 10 zlokalizowane są aminokwasy zaangażowane w wiązanie jonu cynku, który jest kofaktorem w reakcji enzymatycznej CPA1, oraz miejsca wiążące substrat. Mutacje w tym regionie mogą mieć zatem wpływ na obniżenie aktywności białka lub jego całkowitą dysfunkcję.

## **Współwystępowanie mutacji – analiza genotypów**

W niniejszej pracy wykazano duże zróżnicowanie w liczebności i lokalizacji mutacji genu *CPA1*, zróżnicowanie to dotyczyło wszystkich grup badanych. Jak wspomniano, podczas wstępnych analiz zidentyfikowano obszar o wysokim potencjale mutagennym. W związku z tym, przeprowadzono nowatorskie badania, których celem było wyselekcjonowanie zestawu mutacji, które pozwoliły wskazać na większe ryzyko wystąpienia OZT. Analizowano współwystępowanie konfiguracji, w których ilość mutacji wahała się od 2 do 11 mutacji. Nie wykazano bezpośredniej korelacji pomiędzy współwystępowaniem konkretnych konfiguracji mutacji, a ryzykiem wystąpienia OZT. Niemniej jednak, analizując szczególne przypadki takie jak występowanie mutacji protekcyjnej, określono, że obecność mutacji p.Ile209Phe chroniła przed wystąpieniem OZT (25/184 kontrole vs. 16/301OZT), jednak w grupie nosicieli współwystępowanie mutacji w tym samym egzonie (mutacja p.Asp211Asn) siedmiokrotnie zwiększało

ryzyko wystąpienia zapalenia. Analiza pomiędzy średnim wiekiem w tych grupach co prawda nie wykazała istotności statystycznej, ale można przypuszczać, że u części kontroli (średni wiek to 48 lat) w przyszłości może wystąpić OZT (średni wiek chorych to 55 lat). W przypadku analizy etiologii zapalenia u chorych nosicieli dwóch mutacji nie zaobserwowano zależności statystycznej.

### **Mutacje *CPAI* w korelacji z określonym czynnikiem etiologicznym**

Ważnym aspektem jest badanie wpływu mutacji w zależności od określonego klinicznie czynnika etiologicznego. Jak wspomniano wcześniej, jednym z najczęściej diagnozowanych czynników etiologicznych zapalenia trzustki jest alkohol, z drugiej strony nie u wszystkich alkoholików dochodzi do powstania zapalenia. Nasuwa się zatem pytanie, jaki czynnik wpływa na to zjawisko oraz czy istnieją predyspozycje genetyczne chroniące przed zaburzeniami homeostazy trzustki pomimo działania niekorzystnych czynników takich jak alkohol? W literaturze światowej często poruszany jest ten aspekt. Badania prowadzone przez Cichoż-Lach H. i wsp. [141] nie potwierdziły zależności pomiędzy mutacjami w genach *CTRC* (p.Trp55\*, p.Arg254Trp i c.738\_761del), a ryzykiem wystąpienia przewlekłego zapalenia trzustki na podłożu alkoholowym, w populacji polskiej. Badania prowadzone przez Ní Chonchubhair H.M. [142] co prawda wykazały zależność pomiędzy występowaniem mutacji *SPINK1* p.Asn34Ser

w populacji Irlandczyków, jednak w grupie badanej analizowano zarówno PZT alkoholowe jak i PZT o nieokreślonym czynniku etiologicznym. Brak zależności pomiędzy mutacją *SPINK1* p.Asn34Ser a PZT o podłożu alkoholowym stwierdził również Masamune i wsp.[143] podkreślając jednocześnie ważną rolę mutacji w PZT o podłożu niealkoholowym. Rosendahl J. i wsp.[144] w publikacji z 2017 roku prezentującej badania GWAS (ang. *Genom-Wide Association Study*) prowadzonej na największej dotąd populacji europejskiej, w której jako grupę kontrolną obrano osoby zdrowe nienadużywające alkoholu jak również osoby nadużywające alkoholu, ale bez oznak PZT, określono zależność pomiędzy mutacją *ADH1B* p.His48Arg (c.143A>G), a ryzykiem wystąpienia PZT o podłożu alkoholowym. Określono również zależność pomiędzy mutacjami w *locus CTRB1-CTRB2*, a ryzykiem wystąpienia PZT, gdzie wykazano istotność statystyczną w porównaniu do grupy kontrolnej alkoholików jak również osób nienadużywających alkoholu. Badania prowadzone przez Witt i wsp. [56] określające zależność pomiędzy mutacjami w *CPAI*, a ryzykiem PZT przeprowadzone

były w grupie pacjentów PZT o podłożu niealkoholowym. Do tej pory w literaturze nie ma wzmianek na temat zależności pomiędzy wystąpieniem mutacji *CPAI*, a ryzykiem wystąpienia PZT lub OZT o podłożu alkoholowym. W niniejszych badaniach również nie zaobserwowano zależności pomiędzy OZT o podłożu alkoholowym, a mutacjami w *CPAI*. Zidentyfikowano natomiast 32 mutacje unikalne dla chorych na OZT o podłożu alkoholowym. Brak zależności może być warunkowany brakiem grupy kontrolnej składającej się z osób nadużywających alkoholu, u których nie wystąpiło OZT. Analiza mutacji w tej szczególnej grupie pozwoliłaby określić markery wrażliwości na wystąpienie choroby w zależności od czynnika środowiskowego – spożywania alkoholu. Z punktu widzenia profilaktyki zapaleń trzustki, identyfikacja tych mutacji mogłaby stanowić podstawę do wdrożenia zmian w stylu życia pacjentów.

### **Czynnik etiologiczny oraz mutacje genetyczne w aspekcie przebiegu zapalenia nawrotowości oraz powikłań miejscowych**

W literaturze wiele jest doniesień na temat czynników mających wpływ na dalszy przebieg zapalenia trzustki, między innymi na nawrotowość lub przejście do stanu przewlekłego. Jak wspomniano we wstępie, średnio w przypadku 11 - 32 % osób, u których wystąpiło OZT dojdzie do nawrotu choroby, a spożywanie alkoholu i palenie tytoniu stanowią czynnik ryzyka wystąpienia nawrotu zapalenia. Aoun i wsp. [145] określili, że ryzyko wystąpienia nawrotu wzrasta dziewiętnastokrotnie u nosicieli mutacji *SPINK1* p.Asn34Ser, jednak sama mutacja nie warunkuje wystąpienia OZT. LaRusch i wsp.[146] stwierdzili brak zależności pomiędzy występowaniem mutacji *CTRC* p.Gly60=(c.180C>T), a wystąpieniem nawrotu OZT. Mudanna i wsp, [137] nie wykazali zależności pomiędzy mutacjami genów *SPINK1* i *CASR*. W literaturze brak jest danych na temat mutacji genu *CPAI* i ich roli w nawrotach choroby.

Wyniki analizy przeprowadzonej w ramach niniejszej pracy, jednoznacznie wskazują, że w grupie OZT o podłożu alkoholowym częściej obserwowano nawrót choroby ( $p=0,0297$ ; dokładny test Fishera). Jednocześnie nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy częstością występowania mutacji, a nawrotowością, zaobserwowano jednak tendencję statystyczną w przypadku jednej mutacji (c.987+98A>T;  $p=0,0885$ ). Mutacja była identyfikowana zarówno u kontroli (8 przypadków) jak i w grupie chorych na OZT (3 przypadki), a u wszystkich zaobserwowano nawrót choroby. Mutacja ta nie była identyfikowana wcześniej w żadnych innych badaniach.

Analizując korelację pomiędzy mutacjami w genie *CPAI* a przebiegiem OZT, wykazano istotność statystyczną w przypadku tranzycji c.484-35A>G ( $p=0,017$ ; dokładny test Fishera). Mutacja występowała wyłącznie w grupie OZT o przebiegu ciężkim, z tego względu nie określono w jakim stopniu mutacja może zwiększać ryzyko wystąpienia OZT o przebiegu ciężkim. W analizie genotypów i częstości występowania alleli dla mutacji, w której zidentyfikowano homozygoty nie wykazano korelacji z przebiegiem choroby. W literaturze brak jest danych dotyczących wpływu mutacji *CPAI* na przebieg OZT, jednak zaobserwowano, że mutacje w innych genach, choć identyfikowane u mniej niż 5% chorych mogą mieć wpływ na przebieg zapalenia. Papachristou i wsp. [147] badali wpływ polimorfizmu g.2518A>G w genie *MCP-1* na przebieg zapalenia. Wykazano, że genotyp A/G i G/G zwiększał ryzyko OZT o przebiegu ciężkim 7-krotnie, przy czym analiza obejmowała 14 przypadków OZT o przebiegu ciężkim, 63 pacjentów o przebiegu łagodnym i 116 osób zdrowych. Analiza genetyczna przeprowadzona przez D'Oliveira i wsp. [148] potwierdziła, że mutacje w genie *CASP9* mają wpływ na ryzyko wystąpienia OZT o przebiegu umiarkowanym. Badania przeprowadzone przez Koziół i wsp. [52] potwierdzają, że wystąpienie mutacji w genie *SPINK1* predysponowały pacjentów do ciężkiego przebiegu choroby. Kolejny bardzo ważny aspekt stanowią powikłania po ostrym zapaleniu trzustki. W niniejszej pracy, po raz pierwszy analizowano wpływ mutacji w genie *CPAI* na ryzyko wystąpienia powikłań miejscowych (torbieli trzustki). Torbiel trzustki wykryto u 7% badanych (20/301), a 5 z nich było nosicielami dwóch mutacji sąsiadujących (c.987+57G>A/c.987+60T>A,C). Oszacowano, że współwystępowanie mutacji zwiększało ryzyko wystąpienia torbieli 5-krotnie. Analizując dostępne dane literaturowe, torbiele to najczęstsze powikłania miejscowe po OZT i średnio są diagnozowane u 5% pacjentów jednak widać zróżnicowanie w zależności od szerokości geograficznej, etiologii zapalenia oraz wieku [149,150]. Brak jest danych na temat mutacji genetycznych i ich roli w występowaniu powikłań miejscowych po OZT, jednak w ostatnim czasie przeprowadzono wiele badań nad rolą mutacji genetycznych w możliwej progresji zmian torbielowatych do nowotworu [151].

### **Mutacje genetyczne w aspekcie obciążenia rodzinnego**

Obserwacje dotyczące występowania chorób u więcej niż jednego członka rodziny są niezwykle istotne. W literaturze dostępnych jest wiele analiz dotyczących rodzinnego zapalenia trzustki, dla którego z sukcesem opisano wiele mutacji genetycznych, między

innymi w genach *PRSSI*, *SPINK1*. W niniejszej pracy dane dotyczące wywiadu rodzinnego były zebrane w przypadku 258/301 pacjentów z OZT, z czego dodatni wywiad rodzinny odnotowano w 35 przypadkach. Nie zaobserwowano bezpośredniej zależności pomiędzy dodatnim wywiadem rodzinnym, a wystąpieniem mutacji. W przypadku mutacji p.Ale208Thr, dla której określono rozkład genotypów i alleli nie wykazano istotności statystycznej, jednak mutacja była obecna tylko w grupie pacjentów, u których nie odnotowano dodatniego wywiadu rodzinnego (18/221 vs. 0/35). Przypuszczalnie mutacja może mieć znaczenie dla wystąpienia zapalenia w przypadku współwystępujących czynników środowiskowych, a nie predyspozycji dziedzicznych.

Reasumując dotychczas opisane mechanizmy indukcji procesu zapalnego w trzustce związanego z wystąpieniem mutacji genetycznych opierają się na czterech filarach. Pierwszy – wzmożona konwersja trypsynogenu do trypsyny (mutacje *PRSSI*), drugi – zaburzenia w mechanizmach chroniących przed aktywacją trypsynogenu (mutacje *SPINK1* i *CTRC*), trzeci – zaburzenia w homeostazie wywołane zmianą pH soku trzustkowego (*CFTR*), czwarty – wystąpienie stresu siateczki śródplazmatycznej na drodze akumulacji źle sfałdowanego białka (*CPAI*) [87,152,153]. W niniejszej pracy zidentyfikowano szereg nowych mutacji genu *CPAI*, określono zależności pomiędzy częstością występowania, a ryzykiem zachorowania na ostre zapalenie trzustki. Porównano częstości występowania mutacji w populacji województwa świętokrzyskiego do populacji europejskiej i chińskiej, wyselekcjonowano mutacje charakterystyczne dla badanej populacji. Otrzymane wyniki wskazują na związek pomiędzy występowaniem mutacji w genie *CPAI*, a ryzykiem wystąpienia OZT.

## 6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników badań wysunięto poniższe wnioski:

1. Gen *CPAI* charakteryzuje się dużą zmiennością sekwencji; mutacje regionu obejmującego egzon 5 występują statystycznie istotnie częściej u chorych na OZT, zwiększając ryzyko choroby pięciokrotnie.
2. Mutacje genu *CPAI* występujące pojedynczo lub współwystępujące istotnie wpływają na ryzyko zachorowania na OZT.
3. Istnieje zależność pomiędzy nosicielstwem mutacji, a zwiększonym ryzykiem powikłań miejscowych po OZT.
4. Analiza współwystępowania mutacji jest niezwykle istotna w procesie identyfikacji potencjalnych czynników ryzyka choroby.

## **7. Piśmiennictwo**

1. Tulp N. *Observationes medicae. Libri quatuor.* Amstelredami: Ludovicum Elzevirium; 1652.
2. Navarro S. Historical review of our knowledge of acute pancreatitis. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;41(2):143.e1-143.e10.
3. Pannala R, Kidd M, Modlin IM. Acute Pancreatitis: A Historical Perspective. *Pancreas.* 2009;38(4):355–66.
4. Kozieł D, Głuszek S. Epidemiology of acute pancreatitis in Poland – selected problems. *Med Stud.* 2016;32(1):1–3.
5. Spanier BWM, Dijkgraaf MGW, Bruno MJ. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008;22(1):45–63.
6. Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology.* 2017;17(2):155–65.
7. Yadav D, Timmons L, Benson JT, Dierkhising RA, Chari ST. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: A population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(12):2192–9.
8. Bilal M, Kline KT, Trieu JA, Sarairoh H, Desai M, Parupudi S, et al. Trends in same-admission cholecystectomy and endoscopic retrograde cholangiopancreatography for acute gallstone pancreatitis: A nationwide analysis across a decade. *Pancreatology.* 2019;19(4):524–30.
9. Krishna SG, Kamboj AK, Hart PA, Hinton A, Conwell DL. The Changing Epidemiology of Acute Pancreatitis Hospitalizations: A Decade of Trends and the Impact of Chronic Pancreatitis. *Pancreas.* 2017;46(4):482–8.
10. Roberts SE, Thorne K, Evans PA, Akbari A, Samuel DG, Williams JG. Mortality following acute pancreatitis: Social deprivation, hospital size and time of admission: Record linkage study. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(1).

11. Chung SD, Chen KY, Xirasagar S, Tsai MC, Lin HC. More than 9-times increased risk for pancreatic cancer among patients with acute pancreatitis in chinese population. *Pancreas*. 2012;41(1):142–6.
12. Sadr-Azodi O, Andrén-Sandberg Å, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking, smoking cessation and acute pancreatitis: A prospective population-based study. *Gut*. 2012;61(2):262–7.
13. Floyd AK, Pedersen L, Lauge Nielsen G, Thorlacius-Ussing O, Sorensen HT. Secular trends in incidence and 30-day case fatality of acute pancreatitis in North Jutland County, Denmark: A register-based study from 1981-2000. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(12):1461–5.
14. Ouyang G, Pan G, Liu Q, Wu Y, Liu Z, Lu W, et al. The global, regional, and national burden of pancreatitis in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *BMC Med*. 2020;18(1):1–13.
15. Li C li, Jiang M, Pan C qiu, Li J, Xu L gang. The global, regional, and national burden of acute pancreatitis in 204 countries and territories, 1990–2019. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):1–12.
16. Głuszek S, Kozieł D. Prevalence and progression of acute pancreatitis in the Świętokrzyskie Voivodeship population. *Pol Przegl Chir*. 2012;84(12):618–25.
17. Drake M, Dodwad SJM, Davis J, Kao LS, Cao Y, Ko TC. Sex-related differences of acute and chronic pancreatitis in adults. *J Clin Med*. 2021;10(2):1–11.
18. Lankisch PG, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Acute pancreatitis: Does gender matter? *Dig Dis Sci*. 2001;46(11):2470–4.
19. Maśliński S, Ryżewski J. *Patofizjologia, podręcznik dla studentów medycyny*. Wydanie II. Warszawa: PZWL; 2002.
20. Weiss FU, Laemmerhirt F, Lerch MM. Etiology and Risk Factors of Acute and Chronic Pancreatitis. *Visc Med*. 2019;35(2):73–81.
21. Dedemadi G, Nikolopoulos M, Kalaitzopoulos I, Sgourakis G. Management of patients after recovering from acute severe biliary pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34):7708–17.

22. Frantz EDC, de Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreas: Anatomy, diseases and health implications. In: Satou A, Nakamura H, editors. *Pancreas: Anatomy, Diseases and Health Implications*. Nova Biomedical; 2012. p. 1–52.
23. Kirkegård J, Cronin-Fenton D, Heide-Jørgensen U, Mortensen FV. Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1729–36.
24. Opie EL. The Relation op Cholelithiasis to Disease of The Pancreas and to Fat Necrosis. *Am J Med Sci*. 1901;121(1):27–42.
25. Mann FC, Giordano AS. The bile factor in pancreatitis. *Arch Surg*. 1923;6:1–30.
26. Hernández CA, Lerch MM. Sphincter stencels and gallstone migration through the biliary tract. *Lancet*. 1993;341(8857):1371–3.
27. Rünzi M, Saluja A, Lerch MM, Dawra R, Nishino H, Steer ML. Early ductal decompression prevents the progression of biliary pancreatitis: An experimental study in the opossum. *Gastroenterology*. 1993;105(1):157–64.
28. Sand J, Lankisch PG, Nordback I. Alcohol consumption in patients with acute or chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2007;7(2–3):147–56.
29. Criddle DN. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. *Pancreatology*. 2015;15(4):S6–12.
30. Irving HM, Samokhvalov A V., Rehm J. Alcohol as a risk factor for pancreatitis. A systematic review and meta-analysis. *J Pancreas*. 2009;10(4):387–92.
31. Huang W, Booth DM, Cane MC, Chvanov M, Javed MA, Elliott VL, et al. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. *Gut*. 2014;63(8):1313–24.
32. Tortorici G, Zhang BX, Xu X, Muallem S. Compartmentalization of Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> pools in pancreatic acini. Implications for the quantal behavior of Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem*. 1994;269(47):29621–8.
33. Garg R, Rustagi T. Management of Hypertriglyceridemia Induced Acute Pancreatitis. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1-12.

34. Scherer J, Singh VP, Pitchumoni CS, Yadav D. Issues in Hypertriglyceridemic Pancreatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(3):195–203.
35. de Pretis N, Amodio A, Frulloni L. Hypertriglyceridemic pancreatitis: Epidemiology, pathophysiology and clinical management. *United Eur Gastroenterol J*. 2018;6(5):649–55.
36. Jin J, Yu YH, Zhong M, Zhang GW. Analyzing and identifying risk factors for acute pancreatitis with different etiologies in pregnancy. *J Matern Neonatal Med*. 2015;28(3):267–71.
37. Lloret Linares C, Pelletier AL, Czernichow S, Vergnaud AC, Bonnefont-Rousselot D, Levy P, et al. Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia. *Pancreas*. 2008;37(1):13–8.
38. Brahm A, Hegele RA. Hypertriglyceridemia. *Nutrients*. 2013;5(3):981–1001.
39. Murphy MJ, Sheng X, MacDonald TM, Wei L. Hypertriglyceridemia and Acute Pancreatitis. *JAMA Intern Med*. 2013; 28;173(2):162.
40. Freeman ML, DiSario JA, Nelson DB, Fennerty MB, Lee JG, Bjorkman DJ, et al. Risk factors for post-ercp pancreatitis: A prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2001;54(4):425–34.
41. Fluhr G, Mayerle J, Weber E, Aghdassi A, Simon P, Gress T, et al. Pre-study protocol MagPEP: a multicentre randomized controlled trial of magnesium sulphate in the prevention of post-ERCP pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:1–6.
42. Noble MD, Romac J, Vigna SR, Liddle RA. A pH-sensitive, neurogenic pathway mediates disease severity in a model of post-ERCP pancreatitis. *Gut*. 2008;57(11):1566–71.
43. Matykiewicz J, Głuszek S, Koziel D. Ostre zapalenie trzustki - Powikłanie endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej. *Prz Gastroenterol*. 2012;7(2):103–7.
44. Głuszek S, Matykiewicz J, Koziel D, Klimer D, Wawrzycka I, Ogonowska A. Risk factors of pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography - A retrospective cohort study. *Pol Prz Chir Polish J Surg*. 2015;87(10):499–505.

45. Mohseni S, Holzmacher J, Sjolín G, Ahl R, Sarani B. Outcomes after resection versus non-resection management of penetrating grade III and IV pancreatic injury: A trauma quality improvement (TQIP) databank analysis. *Injury*. 2018;49(1):27–32.
46. Ragulin-Coyne E, Witkowski ER, Chau Z, Wemple D, Ng SC, Santry HP, et al. National trends in pancreaticoduodenal trauma: interventions and outcomes. *HPB*. 2014;16(3):275–81.
47. Nitsche C, Maertín S, Scheiber J, Ritter CA, Lerch MM, Mayerle J. Drug-Induced Pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012; 8;14(2):131–8.
48. Kaurich T. Drug-induced acute pancreatitis. *Proc Bayl Univ Med Cent*. 2008;21(1):77–81.
49. Alves C, Batel-Marques F, Macedo AF. A meta-analysis of serious adverse events reported with exenatide and liraglutide: Acute pancreatitis and cancer. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;98(2):271–84.
50. Thisted H, Jacobsen J, Munk EM, Nordgaard B, Friis S, McLaughlin JK, et al. Statins and the risk of acute pancreatitis: a population-based case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(1):185–90.
51. Deng Y, Li Z. Effects of PRSS1-PRSS2 rs10273639, CLDN2 rs7057398 and MORC4 rs12688220 polymorphisms on individual susceptibility to pancreatitis: A meta-analysis. *Genomics*. 2020;112(1):848–52.
52. Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, Chlopek M, Pieciak L. Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTRC genes in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2015;15(1):1–9.
53. Ravi Kanth V, Nageshwar Reddy D. Genetics of acute and chronic pancreatitis: An update. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5(4):427–37.
54. Zhou J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(8):1238–46.
55. Whitcomb DC, LaRusch J, Krasinskas AM, Klei L, Smith JP, Brand RE, et al. Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1349–54.

56. Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013;45(10):1216–20.
57. Weiss FU, Laemmerhirt F, Lerch MM. Acute pancreatitis: Genetic risk and clinical implications. *J Clin Med.* 2021;10(2):1–13.
58. van den Berg FF, Kempeneers MA, van Santvoort HC, Zwinderman AH, Issa Y, Boermeester MA. Meta-analysis and field synopsis of genetic variants associated with the risk and severity of acute pancreatitis. *BJS open.* 2020;4(1):3–15.
59. Raphael KL, Willingham FF. Hereditary pancreatitis: Current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol.* 2016;9:197–207.
60. Witt H, Luck W, Hennies HC, Claßen M, Kage A, Laß U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2000;25(2):213–6.
61. Tang XY, Zou WB, Yu FF, Wang L, Ru N, Zhu JH, et al. Meta-analysis of the impact of the SPINK1 c.194 + 2T > C variant in chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis.* 2020;52(2):143–8.
62. Lempinen M, Paju A, Kempainen E, Smura T, Kylänpää ML, Nevanlinna H, et al. Mutations N34S and P55S of the SPINK1 gene in patients with chronic pancreatitis or pancreatic cancer and in healthy subjects: A report from Finland. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40(2):225–30.
63. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ózsvári B, Landt O, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2008;40(1):78–82.
64. Beer S, Zhou J, Szabó A, Keiles S, Chandak GR, Witt H, et al. Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut.* 2013;62(11):1616–24.
65. Głuszek S, Kowalik A, Koziel D, Wawrzycka I, Głuszek-Osuch M, Matykiewicz J. CTRC gene polymorphism may increase pancreatic cancer risk – preliminary study. *Polish J Surg.* 2017;89(5):48–53.

66. Gasiorowska A, Talar-Wojnarowska R, Czupryniak L, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, et al. The prevalence of cationic trypsinogen (PRSS1) and serine protease inhibitor, kazal type 1 (SPINK1) gene mutations in polish patients with alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2011;56(3):894–901.
67. Gray VS, Criq MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(1):93–115.
68. Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *J Cyst Fibros.* 2012;11(5):355–62.
69. Masson E, Chen JM, Scotet V, Le Maréchal C, Férec C. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Hum Genet.* 2008;123(1):83–91.
70. Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, Kovacs P, Teich N, Bödeker H, et al. CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: Is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut.* 2013;62(4):582–92.
71. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutations in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996;14:141–5.
72. de las Heras-Castaño G, Castro-Senosiaín B, Fontalba A, López-Hoyos M, Sánchez-Juán P. Hereditary pancreatitis: Clinical features and inheritance characteristics of the R122C mutation in the cationic trypsinogen gene (PRSS1) in six spanish families. *J Pancreas.* 2009;10(3):249–55.
73. Grocock CJ, Rebours V, Delhaye MN, Andrén-Sandberg Å, Weiss FU, Mountford R, et al. The variable phenotype of the p.A16V mutation of cationic trypsinogen (PRSS1) in pancreatitis families. *Gut.* 2010;59(3):357–63.
74. Sossenheimer MJ, Aston CE, Preston RA, Gates LK, Ulrich CD, Martin SP, et al. Clinical characteristics of hereditary pancreatitis in a large family, based on high-risk haplotype. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(7):1113–6.

75. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Le Maréchal C, Hentic O, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: A national series. *Gut*. 2009;58(1):97–103.
76. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(3):252–61.
77. Sibert JR. Hereditary pancreatitis in England and Wales. *J Med Genet*. 1978;15(3):189–201.
78. Szabó A, Sahin-Tóth M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20701–10.
79. Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen J min, Kähne T, Drenth JP, et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2006;38(6):668–73.
80. Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, et al. A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. *Gut*. 2009;58(6):820–4.
81. Suzuki M, Minowa K, Nakano S, Isayama H, Shimizu T. Genetic abnormalities in pancreatitis: An update on diagnosis, clinical features, and treatment. *Diagnostics*. 2021;11(1):1–12.
82. Hegyi E, Sahin-Tóth M. Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut*. 2019 Feb;68(2):301–12.
83. Tamura K, Yu J, Hata T, Suenaga M, Shindo K, Abe T, et al. Mutations in the pancreatic secretory enzymes CPA1 and CPB1 are associated with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(18):4767–72.
84. Kujko AA, Berki DM, Oracz G, Wejnarska K, Antoniuk J, Wertheim-Tysarowska K, et al. A novel p.Ser282Pro CPA1 variant is associated with autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2017;66(9):1728–30.

85. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson EM, Andréasson AC, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2016;24(4):593–607.
86. Masamune A, Kotani H, Sörgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, et al. Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1626-1641.e8.
87. Oracz G, Zaród M, Ewers M, Laumen H, Gambin T, Kamiński P, et al. Loss of function TRPV6 variants are associated with chronic pancreatitis in nonalcoholic early-onset Polish and German patients. *Pancreatology.* 2021;21(8):1434–42.
88. Rosołowski M, Lipiński M, Dobosz M, Durlík M, Głuszek S, Kuśnierz K, et al. Management of acute pancreatitis (AP) -Polish pancreatic club recommendations. *Prz Gastroenterol.* 2016;11(2):65–72.
89. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Classification of acute pancreatitis - 2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut.* 2013;62(1):102–11.
90. Sarr MG. 2012 revision of the Atlanta classification of acute pancreatitis. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123(3):118–24.
91. Zerem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complications. *World J Gastroenterol.* 2014;20(38):13879–92.
92. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut.* 1984 Aug;25:1340–6.
93. Papachristou GI, Muddana V, Yadav D, Oconnell M, Sanders MK, Slivka A, et al. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(2):435–41.
94. Kozieł D, Kozłowska M, Deneka J, Matykiewicz J, Głuszek S. Retrospective analysis of clinical problems concerning acute pancreatitis in one treatment center. *Prz Gastroenterol.* 2013;8(5):320–6.
95. Testoni PA. Acute recurrent pancreatitis: Etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20(45):16891.

96. Yadav D, Connell MO, Papachristou GI. Natural History Following the First Attack of Acute Pancreatitis. 2012;107:1096–103.
97. Jagannath S, Garg PK. Recurrent Acute Pancreatitis: Current Concepts in the Diagnosis and Management. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2018 Dec 19;16(4):449–65.
98. Braganza JM, Lee SH, Mccloy RF, McMahan MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2011;377(9772):1184–97.
99. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic Pancreatitis: Diagnosis, Classification, and New Genetic Developments. 2001;682–707.
100. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204–18.
101. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000;190(2):117–25.
102. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 2010;140(6):771–6.
103. Tao Y, Shao F, Cai M, Liu Z, Peng Y, Huang Q, et al. Activated Pancreatic Stellate Cells Enhance the Warburg Effect to Cause the Malignant Development in Chronic Pancreatitis. *Front Oncol*. 2021;11:1–13.
104. Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- $\kappa$ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget*. 2016;7(27):41974–85.
105. Henríquez-Olguín C, Altamirano F, Valladares D, López JR, Allen PD, Jaimovich E. Altered ROS production, NF- $\kappa$ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2015;1852(7):1410–9.
106. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011;13(3):184–90.

107. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454:455–62.
108. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:862–94.
109. Hetz C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(2):89–102.
110. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol*. 2012;22(16):R622–6.
111. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(1081):1081–6.
112. Lencer WI, DeLuca H, Grey MJ, Cho JA. Innate immunity at mucosal surfaces: The IRE1-RIDD-RIG-I pathway. *Trends Immunol*. 2015;36(7):401–9.
113. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(1):7.
114. Lu M, Lawrence DA, Marsters S, Acosta-Alvear D, Kimmig P, Mendez AS, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. 2014;345(98):98–101.
115. Kohl S, Zobor D, Chiang WC, Weisschuh N, Staller J, Menendez IG, et al. Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia. *Nat Genet*. 2015;47(7):757–65.
116. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2014;21(3):396–413.
117. Low JT, Shukla A, Thorn P. Pancreatic acinar cell: New insights into the control of secretion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1586–9.
118. Kubisch CH, Logsdon CD. Endoplasmic reticulum stress and the pancreatic acinar cell. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008;2(2):249–60.
119. Pandol S. *The Exocrine Pancreas*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

120. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79–94.
121. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* 2007;52(1):1–17.
122. Chen JM, Kukor Z, Le Maréchal C, Tóth M, Tsakiris L, Raguénès O, et al. Evolution of Trypsinogen Activation Peptides. *Mol Biol Evol.* 2003;20(11):1767–77.
123. Anson ML. Carboxypeptidase. *J Gen Physiol.* 1937;20(5):663–9.
124. Wei S, Segura S, Vendrell J, Aviles FX, Lanoue E, Day R, et al. Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14954–64.
125. Jitonnom J, Sontag C. Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: First insights from steered molecular dynamics simulations. *J Mol Graph Model.* 2012;38:298–303.
126. Słomski R. Analiza DNA. Teoria i praktyka. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; 2008.
127. Ellard S, Charlton R, Yau M, Gokhale D, Taylor GR. Practice guidelines Interpretation Sanger Sequencing Analysis and. *Clin Mol Genet Soc ,CMGS.* 2009;4.
128. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1–8.
129. Ministry of Health. Program badań przesiewowych noworodków w Polsce na lata 2019-2022. 2018;
130. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;317(23):2402–16.

131. Grant RC, Holter S, Borgida A, Dhani NC, Hedley DW, Knox JJ, et al. Comparison of Practice Guidelines, BRCAPRO, and Genetic Counselor Estimates to Identify Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *J Genet Couns.* 2018;27(4):988–95.
132. Iannuzzi JP, King JA, Leong JH, Quan J, Windsor JW, Tanyingoh D, et al. Global Incidence of Acute Pancreatitis Is Increasing Over Time: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2022;162(1):122–34.
133. Fabisiak N, Fabisiak A, Małecka-Panas E, Gąsiorowska A. Acute pancreatitis – epidemiology, etiology, procedures and treatment: a retrospective cohort study. *Postępy Nauk Med.* 2018;31(2A):22–8.
134. Schwarzenberg SJ, Uc A, Zimmerman B, Wilschanski M, Wilcox CM, Whitcomb DC, et al. Chronic Pancreatitis: Pediatric and Adult Cohorts Show Similarities in Disease Progress Despite Different Risk Factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019;68(4):566–73.
135. Liu Q, Guo L, Zhang S, Wang J, Lin X, Gao F. PRSS1 mutation : a possible pathomechanism of pancreatic carcinogenesis and pancreatic cancer. *Mol Med.* 2019;25(44):1–11.
136. Miller AC, Comellas AP, Hornick DB, Stoltz DA, Cavanaugh JE, Gerke AK, et al. Cystic fibrosis carriers are at increased risk for a wide range of cystic fibrosis-related conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(3):1621–7.
137. Muddana V, Lamb J, Greer JB, Elinoff B, Hawes RH, Cotton PB, et al. Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: Role of serine protease inhibitor Kazal 1type and alcohol. *World J Gastroenterol.* 2008;14(28):4486–91.
138. Wu H, Zhou DZ, Berki D, Geisz A, Zou W Bin, Sun XT, et al. No significant enrichment of rare functionally defective CPA1 variants in a large Chinese idiopathic chronic pancreatitis cohort. *Hum Mutat.* 2017;38(8):959–63.
139. Szmola R, Bence M, Carpentieri A, Szabó A, Costello CE, Samuelson J, et al. Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. *J Biol Chem.* 2011;286(3):1819–27.

140. Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, Chlopek M. CTRC gene polymorphism (p.G60=; c.180 C > T) in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* 2017;17(1):1–7.
141. Cichoż-Lach H, Michalak-Wojnowska M, Lis-Janczarek E, Wojcierowski J, Hydzik M. Do CTRC mutations affect the development of alcoholic chronic pancreatitis and its course among Poles: Preliminary study. *Adv Clin Exp Med.* 2019;28(3):307–12.
142. Ní Chonchubhair HM, Duggan SN, Egan SM, Kenyon M, O’Toole D, McManus R, et al. A high prevalence of genetic polymorphisms in idiopathic and alcohol-associated chronic pancreatitis patients in Ireland. *Hpb.* 2021;23(2):231–7.
143. Masamune A, Kume K, Shimosegawa T. Differential roles of the SPINK1 gene mutations in alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2007;42:135–40.
144. Rosendahl J, Kirsten H, Hegyi E, Kovacs P, Weiss FU, Laumen H, et al. Genome-wide association study identifies inversion in the CTBR1-CTBR2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut.* 2018;67(10):1855–63.
145. Aoun E, Muddana V, Papachristou GI, Whitcomb DC. SPINK1 N34S is strongly associated with recurrent acute pancreatitis but is not a risk factor for the first or sentinel acute pancreatitis event. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(2):446–51.
146. LaRusch J, Lozano-Leon A, Stello K, Moore M, Muddana V, O’Connell M, et al. The common Chymotrypsinogen C (CTRC) variant G60G (C.180T) increases risk of chronic pancreatitis but not recurrent acute Pancreatitis in a North American population. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015;6(1):1-13.
147. Papachristou GI, Sass DA, Avula H, Lamb J, Lokshin A, Barmada MM, et al. Is the Monocyte Chemotactic Protein-1 - 2518 G Allele a Risk. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:475–81.
148. D’Oliveira Martins F, Gomes BC, Rodrigues AS, Rueff J. Genetic susceptibility in acute pancreatitis. *Pancreas.* 2017;46(1):71–6.
149. Muralidharan P, Raj JP, Nathala P. An updated review of pancreatic cystic lesions. *Med Stud.* 2019;35(2):153–63.

150. de Jong K, Bruno MJ, Fockens P. Epidemiology, Diagnosis, and Management of Cystic Lesions of the Pancreas. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:1–8.
151. Singhi AD, McGrath K, Brand RE, Khalid A, Zeh HJ, Chennat JS, et al. Preoperative next-generation sequencing of pancreatic cyst fluid is highly accurate in cyst classification and detection of advanced neoplasia. *Gut*. 2017;67:2131–41.
152. Dytz MG, Arthur P, Marcelino H, Santos ODC, Zajdenverg L, Conceição FL, et al. Clinical aspects of pancreatogenic diabetes secondary to hereditary pancreatitis. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(4):1-6.
153. Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, et al. Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2015;309(8):688–94.

## Streszczenie

Ostre zapalenie trzustki jest powszechną i potencjalnie śmiertelną chorobą układu pokarmowego. W ciągu ostatnich dziesięciu lat OZT stało się jednym z ważniejszych problemów związanych z zaburzeniami układu pokarmowego, a jak pokazują dane epidemiologiczne w skali światowej zachorowalność wzrosła o 63% w ciągu ostatnich 20 lat. Zapalenie trzustki zazwyczaj jest wywoływane przez czynniki inicjujące takie jak kamica żółciowa i nadmierne spożywanie alkoholu, jednak badania wskazują na znaczącą rolę czynnika genetycznego w procesie powstawania zapalenia. Dotychczas określono, że mutacjami zwiększającymi ryzyko zachorowania na OZT są mutacje genu *SPINK1*, *PRSS1*, *CFTR*, *CTRC*, *CTSB*, *CASR*, *TRPV6* oraz *CPAI*. Dotychczasowe badania dotyczące wpływu mutacji genu karboksypeptydazy dają sprzeczne wyniki, w zależności od badanej populacji. W niniejszej pracy przeanalizowano zmienność genu karboksypeptydazy u chorych na ostre zapalenie trzustki.

**Materiały i metody:** Analizie poddano materiał genetyczny wyizolowany z krwi obwodowej 301 pacjentów chorych na ostre zapalenie trzustki oraz 184 osób zdrowych. Ocenę zmienności genu oceniano z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. W pierwszym etapie amplifikowano wybrane fragmenty DNA obejmujące egzony 5 i 6 oraz 8 i 9 wraz z sąsiadującymi intronami. Otrzymane produkty sekwencjonowano metodą sekwencjonowania kapilarnego (MACROGEN, Amsterdam, Holandia) Otrzymane chromatogramy poddano analizie z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania (FinchTV 1.4.0, Geospiza). Mutacje identyfikowano poprzez porównanie do sekwencji referencyjnej (NG\_042276.1). Analiza statystyczna obejmowała identyfikację mutacji korelujących z ryzykiem wystąpienia OZT, etiologią zapalenia, obciążeniem rodzinnym oraz powikłaniami po OZT. Po raz pierwszy poddano analizie współwystępowanie mutacji oraz określono jego wpływ na ryzyko wystąpienia choroby i powikłań po OZT.

**Wyniki:** Zidentyfikowano szereg nowych mutacji genu *CPAI* nie raportowanych wcześniej, jak również zaobserwowano dużą zmienność regionu kodującego gen karboksypeptydazy. Wykazano zależność pomiędzy mutacjami c.1072+84del, c.987+57G>A a zwiększonym ryzykiem zachorowania na OZT. Zidentyfikowano dwie mutacje o charakterze protekcyjnym p. Ile209Phe, c.1072+94del. Określono, że współwystępowanie mutacji p.Ile209Phe oraz mutacji p.Asp211Asn zwiększało szansę wystąpienia choroby siedmiokrotnie u nosicieli mutacji protekcyjnej. Współwystępowanie mutacji c.987+57G>A/c.987+60T>A,C pięciokrotnie zwiększało ryzyko wystąpienia torbieli u chorych na OZT. Występowanie mutacji c.484-35A>G zwiększało ryzyko OZT o przebiegu ciężkim,

**Wnioski:** Gen *CPAI* charakteryzuje się dużą zmiennością sekwencji, oraz regionami w których mutacje zwiększają ryzyko zachorowania na OZT. Mutacje genu *CPAI* występujące pojedynczo lub współwystępujące istotnie wpływają na ryzyko zachorowania na OZT. Istnieje zależność pomiędzy nosicielstwem mutacji a ryzykiem powikłań miejscowych po OZT. Otrzymane wyniki dodatkowo potwierdzają, że analiza

współwystępowania mutacji jest niezwykle istotna w procesie identyfikacji potencjalnych czynników ryzyka choroby.

## Abstract

Acute pancreatitis (AP) is a common and potentially lethal disease. Over the last 10 years, AP has become one of the most important problems related to digestive system disorders, and as shown by epidemiological data on a global scale, the incidence has increased by 63% over the last 20 years. Pancreatitis is usually caused by gallstones and excessive alcohol consumption, but research suggests that genetic factor plays an important role in inflammation development. Thus far, it has been determined that mutations leading to an increase in the risk of AP are located on the *SPINK1*, *PRSS1*, *CFTR*, *CTRC*, *CTSB*, *CASR*, *TRPV6* and *CPA1* genes. Recent studies involving the *CPA1* mutations are ambiguous and dependent on population. In this study, the variability of the carboxypeptidase gene in patients with AP was analyzed.

**Materials and methods:** Genetic material was isolated from the blood of 301 patients with AP and 184 healthy individuals. Identification of the mutations was performed using molecular biology methods. In the first step, selected DNA fragments were amplified (exons 5, 6, 8, and 9 with adjacent introns). The resulting products were sequenced by capillary sequencing (MACROGEN, Amsterdam, The Netherlands). The chromatograms were analyzed using dedicated software (FinchTV 1.4.0, Geospiza). Mutations were identified by comparison to the reference sequence (NG\_042276.1). Statistical analysis included the identification of mutations correlating with the risk of AP, the etiology of inflammation, family history, and complications following AP. For the first time, the coexistence of mutations was analyzed, and its impact on the risk of disease and complications after AP was determined.

**Results:** A number of previously unreported mutations in the *CPA1* gene were identified in addition to a high variability in the carboxypeptidase gene coding region. A correlation between mutations c.1072 + 84del, c.987 + 57G> A and an increased risk of developing AP was found. Two protective mutations, p.Ile209Phe, c.1072 + 94del, were identified. It was also shown that coexistence of the p.Ile209Phe and the p.Asp211Asn led to an increase in the chance of developing the disease sevenfold in carriers of the protective mutation. The coexistence of the c.987 + 57G> A / c.987 + 60T> A, C mutation caused an increase in the risk of cysts fivefold in patients with AP. The presence of the c.484-35A> G mutation led to an increase in the risk of severe AP.

**Conclusions:** The *CPAI* gene is characterized by high sequence variability and regions in which mutations lead to an increase in the risk of developing AP. Single or co-occurring mutations of the *CPAI* gene can significantly affect the risk of developing AP. A relationship between the mutation carrier and the risk of local complications after AP was found. The results additionally confirm that the analysis of mutation coexistence is extremely important in the process of identifying potential risk factors for the disease.

## Spis rycin

- Ryc. 1 Schemat aktywacji enzymów proteolitycznych, TAP- trypsinogen activation peptide. Peptyd aktywujący trypsynogen. [Opracowanie własne na podstawie Pandol S.J. (2010)[120]].
- Ryc. 2 Ułożenie genu CPA1 w klastrze. CPA4 – ekspresja w skórze, CPA5 – ekspresja w jądrach [źródło: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1357>] Data dostępu 06.04.2022.
- Ryc. 3 Model struktury enzymu ProKarboksypeptydazy. Szara część proenzymu – aminokwasy 1 – 110, czerwona część proenzymu – część aktywna enzymu, aminokwasy 111 – 419. (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P15085?model=AF-P15085-F1-model-v2>).
- Ryc. 4 Lokalizacja miejsc zaangażowanych w wiązanie substratu z uwzględnieniem pozycji na sekwencji referencyjnej NP\_001859.1 (Opracowanie własne na podstawie [125]).
- Ryc. 5. Schemat wiązania substratu przez aktywny enzym CPA1 z uwzględnieniem reszt aminokwasowych zaangażowanych w ten proces (numeracja aminokwasów wg. NP\_001859.1(111-419)) [Opracowanie własne na podstawie [125,126]].
- Ryc. 6 Udział czynnika etiologicznego OZT z podziałem na płeć.
- Ryc. 7 Podział na grupy wiekowe z uwzględnieniem czynnika etiologicznego OZT.
- Ryc. 8 Zależność pomiędzy współwystępowaniem mutacji protekcyjnej p.Ile209Phe oraz p.Asp211Asn, test statystyczny: dokładny test Fishera, OR- iloraz szans.

## Spis tabel

- Tab. 1 Przegląd znanych czynników ryzyka ostrego zapalenia trzustki, związanego z nimi patomechanizmu oraz wynikającego z nimi prawdopodobieństwa przejścia w stan przewlekły. (Opracowanie własne na podstawie Weiss i wsp. [20]).
- Tab. 2 Charakterystyka grupy badanej.
- Tab. 3 Normy dla pomiaru DNA metodą spektrofotometryczną [127].
- Tab. 4 Skład mieszaniny reakcyjnej – objętość na jedną reakcję.
- Tab. 5 Sekwencje starterów użytych do reakcji amplifikacji, wielkość powstałego produktu
- Tab. 6 Zoptymalizowane warunki reakcji amplifikacji.
- Tab. 7 Sekwencje starterów wykorzystanych do sekwencjonowania [56].
- Tab. 8 Zależność pomiędzy etiologią OZT a nawrotami choroby, test statystyczny: dokładny test Fishera.
- Tab. 9 Rozkład obciążenia rodzinnego dla OZT ogółem oraz z podziałem na czynnik etiologiczny, test statystyczny: Chi-kwadrat.
- Tab. 10 Rozkład ciężkości zapalenia dla OZT ogółem oraz z podziałem na czynnik etiologiczny.
- Tab. 11 Rozkład mutacji w poszczególnych intronach i egzonach, lokalizacja na podstawie sekwencji referencyjnej NG\_042276.1.
- Tab. 12 Dziesięć najczęściej identyfikowanych mutacji u chorych na OZT i w grupie kontrolnej.
- Tab. 13 Mutacje zmieniające strukturę białka, mutacje egzonowe zidentyfikowane w grupie chorych na OZT i w grupie kontrolnej .
- Tab. 14 Mutacje, dla których wykazano tendencję częstszego występowania w danej grupie badanej (OZT lub kontrolnej), test statystyczny: dokładny test Fishera,  $0,05 < p < 0,1$ .
- Tab.15 Częstość występowania mutacji w grupie chorych na OZT oraz w grupie kontrolnej, dla których wykazano istotność statystyczną, test statystyczny: dokładny test Fishera); OR - iloraz szans; RR - relatywne ryzyko.
- Tab.16 Częstość występowania genotypów oraz alleli w grupie kontrolnej i u chorych na OZT , test statystyczny: dokładny test Fishera.
- Tab.17 Lista mutacji unikalnych dla OZT o podłożu idiopatycznym.
- Tab. 18 Lista mutacji unikalnych dla OZT o podłożu alkoholowym.

- Tab. 19 Lista mutacji charakterystycznych dla OZT o podłożu żółciowym.
- Tab.20 Rozkład genotypów oraz częstość alleli w grupach pacjentów u których zaobserwowano nawrót oraz u pacjentów bez nawrotu. , test statystyczny: dokładny test Fishera.
- Tab.21 Rozkład genotypów i alleli w grupach chorych na OZT w zależności od przebiegu choroby, test statystyczny: dokładny test Fishera.
- Tab. 22 Występowanie mutacji w grupie chorych na OZT w korelacji z przebiegiem zapalenia, test statystyczny: dokładny test Fishera
- Tab.23 Zależność pomiędzy współwystępowaniem mutacji a ryzykiem wystąpienia torbieli, test statystyczny, test statystyczny: dokładny test Fishera, OR- iloraz szans, RR- ryzyko względne.
- Tab. 24 Rozkład genotypów i alleli w grupie chorych na OZT w zależności od obciążenia rodzinnego, test statystyczny: dokładny test Fishera.

Kielce, dn .....

.....  
imię i nazwisko doktoranta  
.....  
kierunek, specjalność  
.....  
rodzaj studiów, forma studiów

### Oświadczenie

Przedkładając pracę doktorską pod tytułem

.....  
.....  
oświadczam, że:

- pracę napisałam/napisałem\* samodzielnie,
- praca nie stanowi istotnego fragmentu lub innych elementów cudzego utworu,
- praca nie narusza żadnych innych istniejących praw autorskich,
- wykorzystane w pracy materiały źródłowe zastosowane zostały z zachowaniem zasad prawa cytatu.

Wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy doktorskiej przez Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach dla celów naukowych i dydaktycznych.

Prawdziwość powyższego oświadczenia potwierdzam własnoręcznym podpisem.

.....  
czytelny podpis doktoranta

\*niewłaściwe skreślić