

Ocena częstości występowania mutacji N34S w genie SPINK1 (*serine protease inhibitor, Kazal type 1*) u chorych na przewlekłe zapalenie trzustki i raka trzustki

Prevalence of the N34S mutation of SPINK1 (*serine protease inhibitor, Kazal type 1*) in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer

Anita Gąsiorowska¹, Renata Talar-Wojnarowska¹, Leszek Czupryniak², Beata Smolarz³, Hanna Romanowicz-Makowska³, Andrzej Kulig³, Ewa Matecka-Panas¹

¹Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

²Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

³Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Przegląd Gastroenterologiczny 2010; 5 (4): 214–221
DOI: 10.5114/pg.2010.14446

Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie trzustki, rak trzustki, trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny.

Key words: chronic pancreatitis, pancreatic cancer, pancreatic secretory trypsin inhibitor.

Adres do korespondencji: dr n. med. Anita Gąsiorowska, Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego, Uniwersytet Medyczny, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź, tel./faks +48 42 678 64 80, e-mail: anita@sofcom.pl

Streszczenie

Wstęp: Dotychczas opublikowane prace wskazują na istotną rolę mutacji w genie kodującym trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny (*pancreatic secretory trypsin inhibitor* – PSTI, określane również jako *serine protease inhibitor, Kazal type 1* – SPINK1) w patogenezie postaci dziedzicznej i idiopatycznej przewlekłego zapalenia trzustki (PZT). Dane dotyczące roli tej mutacji w patogenezie PZT o etiologii alkoholowej pozostają niewyjaśnione. Poszukuje się ponadto roli mutacji genu SPINK1 w rozwoju sporadycznego raka trzustki (RT).

Cel: Ustalenie częstości występowania mutacji SPINK1 u chorych na alkoholowe (PAZT) i idiopatyczne przewlekłe zapalenie trzustki (PIZT), a także na sporadycznego raka trzustki (RT). Poszukiwanie różnic dotyczących przebiegu klinicznego PZT u chorych ze stwierdzonymi mutacjami w porównaniu z chorymi bez mutacji.

Materiał i metody: Rozpoznanie PZT i RT ustalano na podstawie obrazu klinicznego, badań metodami ultrasonografii (USG), tomografii komputerowej (TK) i endoskopowej ultrasonografii (*endoscopic ultrasonography* – EUS). Genomowy DNA wyizolowano z krwi 33 chorych na PAZT, 14 chorych na PIZT, a także 24 chorych na RT. Grupę kontrolną stanowiło 46 pacjentów. Mutację N34S w genie SPINK1 wykrywano z zastosowaniem metody reakcji łańcuchowej polimerazy – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (*polymerase chain*

Abstract

Introduction: In previous investigations, the N34S mutation of the serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) has been reported to have a connection with idiopathic and hereditary chronic pancreatitis, but the association between SPINK1 mutations and the incidence of chronic pancreatitis in alcoholics has been controversial. Additionally, it remains unknown whether the SPINK1 mutations have an impact on the clinical course of CP. No association between SPINK1 mutations and sporadic pancreatic cancer has been found.

Aim: To determine the frequency of SPINK1 mutation in patients with alcoholic chronic pancreatitis (ACP), idiopathic chronic pancreatitis (ICP) and pancreatic cancer (PC). We also reviewed the clinical data of CP patients and analysed the differences of the clinical course of CP between patients with and without SPINK1 mutation.

Material and methods: The diagnosis of CP was based on clinical examinations, ultrasound (US), computed tomography (CT) and endoscopic ultrasonography (EUS). DNA was isolated from 33 patients with ACP, 14 patients with ICP and 24 patients with PC. Forty-six healthy individuals were enrolled as controls. The N34S mutation of SPINK1 was detected with PCR-RFLP.

Results: Among the CP group, in 6 patients (18%) with ACP and 4 patients (28.6%) with idiopathic CP, N34S mutation of

reaction – restriction fragment length polymorphism – PCR-RLFP).

Wyniki: U 6 chorych (18%) na PAZT i u 4 chorych (28,6%) na PIZT stwierdzono mutację N34S w genie SPINK1, natomiast w grupie kontrolnej u 3 osób (6,5%). Częstość występowania mutacji N34S była istotnie większa w grupie chorych na PIZT niż w grupie kontrolnej ($p < 0,024$, OR 5,733, 95% CI 1,218–26,959). Nie odnotowano różnic w przebiegu klinicznym PZT między chorymi ze stwierdzonymi mutacjami w porównaniu z chorymi bez mutacji. W grupie chorych z rozpoznaniem RT u 1 pacjenta (4%) odnotowano obecność mutacji N34S. Nie stwierdzono różnic statystycznych w częstości występowania mutacji u chorych na RT w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,687$, OR 0,623, 95% CI 0,085–4,696).

Wnioski: Uzyskane wyniki własne wykazują dużą częstość występowania mutacji N34S w genie SPINK1 zarówno u chorych z idiopatyczną postacią PZT, jak i w grupie kontrolnej. Wydaje się także, że obecność tej mutacji może sprzyjać rozwojowi PZT u osób nadużywających alkoholu. Istnieje potrzeba dalszych badań, aby określić rolę mutacji N34S w genie SPINK1 w patogenezie RT.

Wstęp

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) jest chorobą charakteryzującą się nieodwracalnymi zmianami morfologicznymi w postaci postępującego uszkodzenia struktur komórkowych zewnątrzwydzielniczych i wewnątrzwydzielniczych oraz przewodów trzustkowych, z następczym rozwojem tkanki łącznej [1–3]. Klinicznym wyrazem tych zmian są bóle w jamie brzusznej oraz postępujące upośledzenie czynności zewnątrzwydzielniczej i wewnątrzwydzielniczej.

Częstość występowania PZT ocenia się na 13–28 przypadków na 100 tys. mieszkańców [4, 5]. W krajach wysoko uprzemysłowionych najczęstszą przyczyną tego schorzenia jest nadużywanie alkoholu. Objawy choroby występują po kilkunastu latach intensywnego picia alkoholu w średniej dawce dobowej 100–150 g (w przeliczeniu na czysty etanol).

Wśród innych czynników etiologicznych PZT wymienia się nieprawidłowości anatomiczne, tj. trzustkę dwudzielną, okołobrodawkową torbiel ściany dwunastnicy, zbliznowacenie przewodu trzustkowego oraz czynniki metaboliczne i autoimmunologiczne. U ok. 30% pacjentów chorujących na PZT nie udaje się zdefiniować czynnika etiologicznego choroby i rozpoznaje się wówczas idiopatyczne PZT (PIZT) [6].

Dobrze udokumentowany jest także udział czynników genetycznych w powstawaniu PZT. W 1996 r. Whitcomb i wsp. po raz pierwszy zidentyfikowali odpowiedzialną za rozwój dziedzicznego zapalenia trzustki (DZT) mutację genu *PRSS1* (*PRoteaSe*, *Serine 1*) kodującego kationowy tripsynogen [7]. Najczęściej występującą mutacją, polegającą na zastąpieniu guani-

ny adenozyną na 3 egzonie genu *PRSS1*, jest synteza kationowego tripsynogenu, w którym w pozycji 122 zamiast argininy (R) wbudowana jest histydyna (H). Zmieniony proenzym jest bardziej oporny na procesy autolizy, które w warunkach fizjologicznych odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności tripsyny wewnątrz komórek pęcherzykowych trzustki.

W minionych kilkunastu latach ukazało się ponadto wiele publikacji wskazujących na istotną rolę trzustkowego inhibitora wydzielania tripsyny (*pancreatic secretory trypsin inhibitor – PSTI*, określanego również jako *serine protease inhibitor, Kazal type 1 – SPINK1*) w patogenezie PZT [8]. Inhibitor ten to peptyd zbudowany z 79 aminokwasów, który pozwala na unieczynnienie ok. 20% uaktywnionej wewnątrztrzustkowo tripsyny. Stanowi tym samym jedną z barier chroniących przed samostrawieniem komórek pęcherzykowych trzustki. Gen kodujący PSTI jest zlokalizowany na 5. chromosomie. Najczęstszą jego mutację określa się jako N34S. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wykazały związek między obecnością mutacji w genie kodującym PSTI a występowaniem zapalenia trzustki. Witt i wsp. wykryli mutację w genie *PSTI* u 23% pacjentów z PIZT, natomiast Pfitzer i wsp. aż u 23 (40,35%) spośród 57 chorych z tym typem zapalenia [8, 9]. Stwierdzono również związek mutacji w genie *PSTI* z PZT o etiologii alkoholowej (PAZT), choć dotychczas uzyskane wyniki cechuje duża różnorodność – z częstością występowania mutacji N34S od 0% aż do 26,8% [10–12].

Conclusions: These preliminary data suggest the high incidence of N34S SPINK1 mutation in the Polish population generally, as well as in ICP. It may be speculated that this mutation contributes to the development of chronic pancreatitis in patients with alcohol overindulgence. Further studies are needed to explore the role of SPINK1 in the carcinogenesis of pancreatic cancer.

ny adenozyną na 3 egzonie genu *PRSS1*, jest synteza kationowego tripsynogenu, w którym w pozycji 122 zamiast argininy (R) wbudowana jest histydyna (H). Zmieniony proenzym jest bardziej oporny na procesy autolizy, które w warunkach fizjologicznych odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności tripsyny wewnątrz komórek pęcherzykowych trzustki.

W minionych kilkunastu latach ukazało się ponadto wiele publikacji wskazujących na istotną rolę trzustkowego inhibitora wydzielania tripsyny (*pancreatic secretory trypsin inhibitor – PSTI*, określanego również jako *serine protease inhibitor, Kazal type 1 – SPINK1*) w patogenezie PZT [8]. Inhibitor ten to peptyd zbudowany z 79 aminokwasów, który pozwala na unieczynnienie ok. 20% uaktywnionej wewnątrztrzustkowo tripsyny. Stanowi tym samym jedną z barier chroniących przed samostrawieniem komórek pęcherzykowych trzustki. Gen kodujący PSTI jest zlokalizowany na 5. chromosomie. Najczęstszą jego mutację określa się jako N34S. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wykazały związek między obecnością mutacji w genie kodującym PSTI a występowaniem zapalenia trzustki. Witt i wsp. wykryli mutację w genie *PSTI* u 23% pacjentów z PIZT, natomiast Pfitzer i wsp. aż u 23 (40,35%) spośród 57 chorych z tym typem zapalenia [8, 9]. Stwierdzono również związek mutacji w genie *PSTI* z PZT o etiologii alkoholowej (PAZT), choć dotychczas uzyskane wyniki cechuje duża różnorodność – z częstością występowania mutacji N34S od 0% aż do 26,8% [10–12].

Przewlekłe zapalenie trzustki jest chorobą o złym rokowaniu klinicznym. Prawie połowa pacjentów z alkoholowym PZT umiera w ciągu 20–25 lat trwania choroby [13]. Dodatkowo warto zaznaczyć, że wieloletnie

PZT jest czynnikiem ryzyka rozwoju raka trzustki (RT). Dowiedziono, że po 20 latach trwania PZT ryzyko wystąpienia RT zwiększa się ponad 25-krotnie [14, 15]. Ponadto ryzyko rozwoju RT zwiększa się jeszcze bardziej w przypadku dziedzicznej postaci zapalenia, wykazano bowiem, że po kilkudziesięciu latach choroby u 40% pacjentów dochodzi do rozwoju RT [16].

Rak zewnątrzwydzielniczej części trzustki stanowi obecnie piątą przyczynę zgonów z powodu nowotworów złośliwych w społeczeństwach wysoko uprzemysłowionych [17]. Według polskich danych epidemiologicznych rocznie na RT umiera 4 tys. osób [18]. Rak tego narządu należy do nowotworów o wyjątkowo złym rokowaniu, tj. średni czas przeżycia większości chorych nie przekracza 6 mies., a odsetek przeżyć 5-letnich 3–5% [19]. Wpływa na to wiele czynników. Jednym z nich jest długi bezobjawowy okres rozwoju, a także brak wczesnych objawów patognomicznych dla tej choroby. Mimo intensywnych badań etiologia RT pozostaje niewyjaśniona. Dotychczas wykazano, że na powstawanie tego schorzenia wpływa wiele czynników zarówno środowiskowych, jak i genetycznych. Środowiskowymi czynnikami ryzyka zachorowania na RT są przede wszystkim: palenie tytoniu, wysokotłuszczowa i wysokokaloryczna dieta, nadużywanie alkoholu, ekspozycja na chlorek winylu, trichloroetylen, polichlorek bifenylu, akrylamid, a także nikiel, chrom i kadm [20–22].

W 5–10% przypadków RT zostały potwierdzone predyspozycje genetyczne do rozwoju tej choroby [23, 24]. Zwiększone ryzyko wystąpienia RT obserwuje się w wielu znanych zespołach genetycznych, takich jak zespół Peutza-Jeghersa, rodzinny nietypowy wieloznamienny zespół czerniaka (*familial atypical multiple mole-melanoma* – FAMMM), zespół rodzinnego raka piersi i jajnika (*hereditary breast and ovarian cancer* – HBOC), zespół Lynch, rodzinna polipowatość gruczolakowata, rodzinna polipowatość młodzieńcza i zespół ataksja–telangiectazja. Ponadto u rodzin, w których wystąpiły dwa lub więcej przypadków RT wśród krewnych I stopnia, a które nie spełniają kryteriów dla żadnego innego zespołu genetycznego, rozpoznaje się rodzinny RT (*familial pancreatic cancer*) [25].

Wyniki dotychczas opublikowanych badań wskazują na duże znaczenie mutacji SPINK1 w różnych typach PZT, choć jej udział w zapaleniu o etiologii alkoholowej pozostaje kontrowersyjny. Podobnie rola mutacji N34S w genie SPINK1 u chorych ze sporadycznym RT wydaje się nie do końca poznana.

Cel

Analiza częstości występowania mutacji N34S w genie SPINK1 u chorych na PZT i sporadycznego RT

oraz poszukiwanie wpływu tej mutacji na przebieg kliniczny, powstanie powikłań i leczenie PZT o odmiennych etiologiach.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano pacjentów chorujących na PZT i sporadycznego RT hospitalizowanych w Klinice Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Łodzi. Grupę kontrolną stanowiło 46 zdrowych ochotników.

Badaniami objęto 47 chorych z PZT (12 kobiet i 35 mężczyzn) w wieku między 18 lat a 66 lat (średnia wieku $44 \pm 7,2$ roku). Rozpoznanie PZT ustalono na podstawie typowych objawów klinicznych, a także nieprawidłowości stwierdzanych w badaniach obrazowych, tj. ultrasonografii (USG) i tomografii komputerowej (TK) jamy brzusznej. Postawienie diagnozy PZT wymagało uwidocznienia następujących nieprawidłowości w badaniach obrazowych: zwapnienia mięszone i/lub przewodowe, poszerzenia i/lub nieregularności ścian przewodu trzustkowego głównego lub przewodów dróg żółtych.

U 33 pacjentów z PZT czynnikiem etiologicznym było nadużywanie alkoholu (PAZT). Dla uznania etiologii alkoholowej PZT konieczne było potwierdzenie przez chorego spożywania alkoholu w ilości 80 g/dobę przez minimum 5 lat. Po wykluczeniu udziału czynników toksycznych, metabolicznych i zaporowych u 14 pacjentów rozpoznano PIZT. W tej grupie osób wyodrębniono młodzieńczą postać PIZT, gdy objawy choroby rozpoczęły się przed 30. rokiem życia ($n = 6$), natomiast u pozostałych 8 pacjentów rozpoznano późną (starczą) postać PIZT. Za początek PZT uznawano wystąpienie pierwszego epizodu ostrego zapalenia trzustki lub rozpoznanie powikłań zapalenia, tj. pseudotorbieli.

W tabeli I przedstawiono charakterystykę demograficzną chorych na PZT, z podziałem na etiologię alkoholową i idiopatyczną.

Do badania włączono ponadto 24 chorych na RT, w tym 12 mężczyzn (50%) i 12 kobiet (50%) diagnozowanych i leczonych w Klinice Chorób Przewodu Pokarmowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Łodzi. U 18 osób rozpoznano raka ustalono na podstawie badania cytologicznego materiału uzyskanego podczas biopsji i/lub badania histologicznego materiału pozyskanego po leczeniu chirurgicznym. U pozostałych chorych diagnozę postawiono na podstawie objawów klinicznych, nieprawidłowości biochemicznych, w tym nieprawidłowych wartości CA19-9, badań obrazowych (USG, TK, ECPW, EUS) oraz losów chorych. Średni wiek chorych w chwili rozpoznania wynosił 69,1 roku. W tej grupie było 5 pacjentów w wieku 40–60 lat, grupa

wiekowa 61–80 lat była najliczniejsza i obejmowała 15 osób, a w najstarszej grupie wiekowej – po 80. roku życia – znalazły się 4 osoby. Najczęstszą lokalizacją zmiany była głowa trzustki (17 chorych – 71%), u 5 osób (21%) zmiana znajdowała się w trzonie, natomiast u 2 osób (8%) zajęty był ogon trzustki. U żadnego z chorych na RT nie stwierdzono w badaniach obrazowych cech morfologicznych świadczących o współistniejącym PZT. U 1 pacjenta (4%) w wywiadzie odnotowano występowanie nowotworu złośliwego trzustki u krewnego I stopnia, w rodzinach pozostałych chorych nie stwierdzono przypadków zachorowań na nowotwór trzustki. W tabeli II przedstawiono charakterystykę demograficzną i kliniczną pacjentów z RT.

Grupę kontrolną stanowiło 46 osób zdrowych (16 kobiet i 30 mężczyzn, średni wiek 35,0 ± 17,9 roku, rozpiętość wieku 21–77 lat).

Protokół badania został zatwierdzony przez regionalną komisję etyki.

Metodyka oznaczania mutacji N34S

Od każdego pacjenta pobierano ok. 10 ml krwi pełnej do probówki z EDTA, którą następnie przechowywano w zamrażarce w temperaturze –27°C. DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej, a następnie amplifikowano za pomocą starterów specyficznych dla fragmentu genu.

Mutacja N34S w genie SPINK1 była wykrywana z zastosowaniem metody reakcji łańcuchowej polimerazy – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*).

Stosowano startery o następujących sekwencjach: starter 1 – 5' TTC TGT TTA ATT CCA TTTT AGG CCA AAT GCT GCA 3', starter 2 – 5' GGC TTTT ATC ATA CAA GTG ACT TCT 3'.

Mieszanina reakcyjna (25 µl) obejmowała: 50 ng DNA (2 µl), 0,2 µM startery (0,5 µl każdego), 50 µM dNTP (deoksynukleotydtrifosforany) (2,5 µl), 2,5 µl buforu 10 × Taq, 1 U polimerazy Taq (TaKaRa, BIOKOM) (2,5 µl) i H₂O. Reakcję prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR system 2400; Perkin Elmer, Norwalk, USA).

Reakcja PCR obejmowała następujące etapy:

- wstępną denaturację w temperaturze 94°C (5 min),
- właściwe 35 cykli, na które składała się: denaturacja w temperaturze 94°C (30 s), hybrydyzacja ze starterami w temperaturze 60°C (30 s) i wydłużanie w temperaturze 74°C (60 s),
- końcowe wydłużanie w temperaturze 72°C (7 min).

Produkt po PCR trawiono z 1U enzymu *PstI* i *BsrDI* w objętości 25 µl przez godzinę, w temperaturze 37°C dla *PstI* i w 55°C dla *BsrDI*. Analizę produktu prowadzono w 7% żelu poliakrylamidowym (PAGE). Po trawieniu

Tabela I. Charakterystyka demograficzna chorych na PZT

Table I. Characteristics of patients with chronic pancreatitis

	PAZT	PIZT
Liczebność grup (n)	33	14
Płeć (M/K), n (%)	29 (88%)/4 (12%)	6 (43%)/8 (57%)
Średnia wieku ± SD [lata]	46 ± 9	42 ± 14
Zakres wieku [lata]	26–66	18–56
Wiek w momencie pojawienia się objawów choroby [lata]	41	37

PAZT – przewlekłe alkoholowe zapalenie trzustki, PIZT – przewlekłe idiopatyczne zapalenie trzustki

PstI niezmutowany produkt odpowiadał długości 320 pz. Po trawieniu enzymem *PstI* produkt o długości 286 pz odpowiadał sekwencji zmutowanej (homozygota). Po trawieniu enzymem *BsrDI* produkt o długości 286 pz odpowiadał sekwencji niezmutowanej. Heterozygota odpowiadała pasmom 320 pz i 286 pz po trawieniu enzymami restrykcyjnymi.

Analiza statystyczna

Dane porównywano przy użyciu testu *t*-Studenta. Wyniki przeprowadzonych badań wyrażono jako średnią ± odchylenie standardowe. Wartość *p* < 0,05 uznano za istotną statystycznie.

Wyniki

Częstość występowania mutacji N34S w genie SPINK1 była istotnie większa u chorych na PZT niż w grupie kontrolnej. Obecność mutacji stwierdzono u 10 pacjentów (21,3%) spośród 47 chorych na PZT, w tym 5 heterozygot i 5 homozygot, natomiast w grupie kontrolnej obecność mutacji N34S odnotowano u 3 (6,5%) spośród 46 pacjentów, w tym 2 heterozygoty i 1 homozygota.

Tabela II. Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem RT

Table II. Characteristics of patients with pancreatic cancer

	Rak trzustki
Liczebność grupy (n)	24
Płeć (M/K)	12/12
Średnia wieku ± SD [lata] (zakres wieku [lata])	69,08 ± 12 (49–87)
Lokalizacja RT (n, %):	
• głowa	18 (75%)
• trzon	4 (17%)
• ogon	2 (8%)

Analizując osoby z PAZT, obecność mutacji N34S stwierdzono u 6 osób (18%), w tym 3 heterozygoty i 3 homozygoty. Nie odnotowano różnic statystycznych w częstości występowania mutacji N34S u chorych na PAZT w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,108$, OR 3,185, 95% CI 0,745–12,606). Wykazano natomiast istotną różnicę w częstości występowania mutacji N34S u pacjentów z PIZT w porównaniu z grupą kontrolną (PIZT vs grupa kontrolna: $p = 0,024$, OR 5,733, 95% CI 1,218–26,959).

W kolejnym etapie wykonano analizę różnic przebiegu klinicznego PAZT i PIZT między chorymi z mutacją SPINK i osobami bez mutacji. Nie stwierdzono różnic dotyczących średniego wieku chorych na PZT w grupach z mutacją i bez mutacji. W grupach tych nie odnotowano różnic dotyczących wieku w momencie rozpoczęcia się objawów choroby. W analizie przebiegu klinicznego PZT brano pod uwagę obecność zaburzeń endokrynnych, występowanie zwapnień i zmian morfologicznych w obrębie przewodów trzustkowych. Uwzględniano także sposób postępowania terapeutycznego, w tym konieczność stałego przyjmowania narkotycznych leków przeciwbólowych, leczenie chirurgiczne i procedury endoskopowe, tj. sfinkterotomię trzustkową, żółciową, protezowanie przewodu Wirsunga i/lub przewodu żółciowego wspólnego oraz drenaż endoskopowy i/lub drenaż zewnętrzny torbieli trzustki. Nie stwierdzono różnic częstości występowania powikłań PZT w postaci torbieli rzekomych i/lub cholestazy lub zaburzeń endokrynnych w grupach w zależności od występowania mutacji. Podobnie częstość występowania zmian w badaniach obrazowych, tj. zwapnień i zmian przewodowych, nie różniła się w grupach chorych z mutacją i bez mutacji. Nie odnotowano również różnic dotyczących sposobu

leczenia między badanymi grupami. Obie grupy nie różniły się także pod względem częstości palenia papierosów (tab. III i IV).

W grupie chorych na RT u 1 osoby (4%) stwierdzono mutację N34S. Nie odnotowano różnic statystycznych w częstości występowania mutacji u chorych na RT w porównaniu z grupą kontrolną (RT vs grupa kontrolna: $p = 0,687$, OR 0,623, 95% CI 0,085–4,696). Szczegółowe wyniki dotyczące częstości występowania mutacji N34S SPINK1 u chorych na PZT, RT i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli V.

Omówienie

W badaniu własnym autorzy analizowali częstość występowania mutacji N34S trzustkowego inhibitora wydzielania trypsyny (PSTI), określanego również jako SPINK1, u chorych na PZT i raka sporadycznego tego narządu. Badaniu poddano chorych na PAZT i PIZT. Wyniki wykazały obecność mutacji u prawie 1/3 pacjentów z idiopatyczną postacią PZT i u 6 spośród 33 chorych (18%) z PZT o etiologii alkoholowej. Dane dotyczące częstości występowania tej mutacji w różnych grupach chorych na PZT są zróżnicowane. Według danych uzyskanych przez Pfitzera i wsp. dwie najbardziej znane mutacje genu SPINK1 – N34S i P55S – są częste, zwłaszcza u dzieci i osób młodocianych z PIZT [9]. Porównując natomiast częstość występowania mutacji N34S u chorych na PAZT w niniejszej pracy z wynikami innych autorów, należy stwierdzić, że w badaniu przeprowadzonym przez autorów tej publikacji częstość była zwiększona. Należy jednak zaznaczyć, że w niniejszej pracy u 3 chorych (6,5%) z grupy kontrolnej stwierdzono obecność mutacji SPINK1, co w porównaniu z innymi danymi z krajów europejskich (1–2%) stanowi również większy odsetek [8, 9, 12, 26].

Tabela III. Porównanie częstości występowania zmian morfologicznych w trzustce, powikłań oraz sposobów leczenia u chorych na PAZT z mutacją N34S SPINK1 i bez tej mutacji

Table III. Comparison of clinical data of alcoholic chronic pancreatitis patients with and without SPINK1 mutation

	Mutacja SPINK1 (n = 6)	Brak mutacji SPINK1 (n = 27)	Wartość p
Cukrzyca	3	12	ns
Zwapnienia	3	8	ns
Pseudotorbiele	2	13	ns
Zmiany w obrębie przewodu Wirsunga	3	5	ns
Cholestaza	2	9	ns
Leczenie:			
• endoskopowe	2	11	ns
• chirurgiczne	2	5	ns
• przewlekłe leczenie przeciwbólowe	2	12	ns

ns – nieistotne statystycznie

Tabela IV. Porównanie częstości występowania zmian morfologicznych w trzustce, powikłań oraz sposobów leczenia u chorych na PIZT z mutacją N34S SPINK1 i bez tej mutacji**Table IV.** Comparison of clinical data of idiopathic chronic pancreatitis patients with and without SPINK1 mutation

	Mutacja SPINK1 (n = 6)	Brak mutacji SPINK1 (n = 27)	Wartość p
Cukrzyca	0	2	ns
Zwapnienia	3	4	ns
Pseudotorbiele	1	1	ns
Zmiany w obrębie przewodu Wirsunga	0	7	ns
Cholestaza	0	5	ns
Leczenie:			
• endoskopowe	0	7	ns
• chirurgiczne	1	3	ns
• przewlekłe leczenie przeciwbólowe	2	2	ns

ns – nieistotne statystycznie

Tabela V. Częstość występowania mutacji SPINK1 u pacjentów z PAZT, PIZT, RT i grupie kontrolnej**Table V.** Distribution of the SPINK1 mutation in patients with chronic pancreatitis, pancreatic cancer and control group

Badane grupy	Mutacja SPINK1		
	n (%)	heterozygoty (n)	homozygoty (n)
PAZT	6 (18)	3	3
PIZT	4 (28,6)	2	2
RT	1 (4)	0	1
grupa kontrolna	3 (6,5)	2	1

PAZT – przewlekłe alkoholowe zapalenie trzustki, PIZT – przewlekłe idiopatyczne zapalenie trzustki, RT – rak trzustki

Celem niniejszej pracy była także ocena wpływu mutacji SPINK1 na przebieg kliniczny PZT o odmiennych etiologiach. Analizie poddano obecność zaburzeń endokrynych, zmian morfologicznych w trzustce, a także sposób leczenia z uwzględnieniem procedur endoskopowych i chirurgicznych. Podobnie jak w innych publikacjach, nie wykazano zależności między nasileniem objawów klinicznych, początkiem choroby a występowaniem zmutowanego genu u chorych na PAZT i PIZT [27, 28]. Nie stwierdzono również różnic w przebiegu klinicznym choroby u osób heterozygotycznych i homozygotycznych.

Chociaż związek mutacji w genie *PSTI* z PZT wydaje się niepodważalny, sporo kontrowersji budzi rola, jaką zmutowany peptyd może odgrywać w patogenezie choroby. Wielu autorów wskazuje, że nie jest ona decydująca. Zmutowany gen występuje w populacji znacznie częściej niż choroby zapalne trzustki. Oznacza to potencjalnie bardzo małą jego penetrację. Niektórzy badacze sugerują, że mutacja genu *PSTI* stanowi jedynie predyspozycję do rozwoju PZT, lecz nie jest jej bezpośrednią przyczyną. Uważają oni, że obecność zmutowanego genu *PSTI* ułatwia jedynie ujawnienie się choroby

u osób obciążonych innymi czynnikami genetycznymi lub środowiskowymi.

Dotychczas opublikowane badania epidemiologiczne potwierdziły jednoznacznie, że długo trwające PZT jest czynnikiem ryzyka rozwoju RT [14]. Ponadto, jak wspomniano we wstępie, ryzyko wystąpienia RT jest również znaczące w wielu zespołach genetycznie uwarunkowanych nowotworów. Należy do nich m.in. FAMMM, a także HBOC [24, 29, 30]. Kolejnym rzadkim zespołem genetycznym związanym ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworu w różnych narządach, w tym predysponującym do wystąpienia RT, jest zespół ataksja-telangiektazja (AT). Należy on do grupy wrodzonych zaburzeń immunologicznych przebiegających z nadmierną łamliwością chromosomów [31]. Istnieją ponadto pojedyncze doniesienia o zwiększonym ryzyku rozwoju RT wśród pacjentów pochodzących z rodzin dotkniętych zespołem rodzinnej polipowatości gruczołakowatej (*familial adenomatous polyposis* – FAP), w zespole Peutza-Jeghersa i zespole Lynch'a predysponujących do rozwoju raka jelita grubego [32–34].

Wielu autorów podkreśla także zwiększone ryzyko zachorowania na RT w przypadku częstego występowania

nia tego nowotworu u blisko spokrewnionych członków rodziny. Badania Tersmette i wsp. wykazały, że ryzyko rozwoju RT wśród krewnych I stopnia pacjenta dotkniętego tym nowotworem jest 18-krotnie zwiększone w rodzinach, w których wystąpiły 2 przypadki RT, i 57-krotnie w rodzinach, których 3 lub więcej członków dotkniętych jest RT [35]. Dotąd jedynym genem, którego konstytucyjne zmiany zostały jednoznacznie opisane jako związane z zespołem rodzinnego RT, jest gen *BRCA2* (*breast cancer 2 gene*).

Mimo że mutacja *PRSS1* jest uznanym czynnikiem ryzyka wystąpienia RT u chorych z dziedziczną formą PZT, to jednak rola innych mutacji, których częstość w różnych typach PZT jest także zwiększona, nie jest poznana [36]. W badaniu własnym, w grupie 24 chorych na RT mutację N34S wykryto u 1 pacjenta. Pozwala to na przypuszczenie, że rozwój tego raka w populacji polskiej nie ma związku z mutacją genu *SPINK1*. Ze względu jednak na małą liczebność badanej grupy zagadnienie to wymaga dalszych badań. Wyniki przeprowadzonego w Finlandii badania oceniającego częstość mutacji N34S i P55S u chorych na PZT i RT potwierdziły związek mutacji N34S z PZT, ale nie wykazały, aby ta mutacja predysponowała do rozwoju RT [37]. Podobne wyniki uzyskali badacze z Włoch, analizując 61 pacjentów ze sporadycznym RT. Mutacje w genie *SPINK1* stwierdzili u 5 chorych na RT (4,1%) i u 4 osób z grupy kontrolnej (2%) [38]. Przeprowadzona przez nich analiza nie wykazała także istotnego znaczenia polimorfizmów glukuronylotransferazy *UGT1A7* i *UGT1A9* w kancerogenezie RT. Autorzy z Niemiec analizowali częstość mutacji N34S *SPINK1* u 159 chorych ze sporadycznym RT. Częstość występowania tej mutacji była nieco mniejsza niż we wcześniejszych badaniach i wynosiła 1,3% w przypadku osób z RT i 1,6% w grupie kontrolnej [39].

Udział mutacji *SPINK1* w patogenezie zarówno sporadycznego RT, jak i rodzinnej postaci tej choroby analizował zespół autorów z Japonii i Stanów Zjednoczonych. Wykazali oni obecność mutacji N34S *SPINK1* u 5 (2,9%) spośród 172 chorych ze sporadycznym RT, natomiast nie stwierdzono obecności tej mutacji u chorych z rodzinnym RT [40]. W innych doniesieniach z Japonii stwierdzono obecność mutacji N34S u blisko 1/3 chorych na RT, który rozwinął się na podłożu PZT [11]. Ozaki i wsp. w badaniach eksperymentalnych na liniach komórkowych RT wykazali, że białko *SPINK1* może stymulować proliferację komórek RT, aktywując receptor dla EGF-R [41].

Dotychczasowe wyniki mogą sugerować, że mutacje w genie *SPINK1* nie są bezpośrednio związane z rozwojem RT, ale raczej zwiększają ryzyko wystąpienia stanu zapalnego, który z kolei może zwiększać ryzyko wystąpienia tego nowotworu. Tę zależność potwier-

dząją coraz częściej publikowane opisy dotyczące pacjentów z przewlekłym wapniejącym zapaleniem trzustki i rakiem gruczołowym trzustki, u których stwierdzono mutację N34S *SPINK1* [42]. Wydaje się jednak niezbędne poddanie dalszej obserwacji pacjentów z PZT, u których wykryto mutacje w genie *SPINK1*, aby jednoznacznie wykluczyć tę mutację jako czynnik predysponujący do rozwoju RT.

Piśmiennictwo

1. Sarles H, Bernard JP, Gullo L. Pathogenesis of chronic pancreatitis. *Gut* 1990; 31: 629-32.
2. Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1482-90.
3. Mayerle J, Lerch MM. Is it necessary to distinguish between alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis? *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 127-30.
4. Copenhagen pancreatitis study. An interim report from a prospective epidemiological multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 1981; 16: 305-12.
5. Lin Y, Tamakoshi A, Matsuno S, et al. Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol* 2000; 35: 136-41.
6. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-707.
7. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-5.
8. Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the serine pro tease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25: 213-6.
9. Pfulter RH, Barmada MM, Brunskill AP, et al. *SPINK1/PST1* polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119: 615-23.
10. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, et al. Absence of *PRSS1* mutations and association of *SPINK1* trypsin inhibitor mutations in hereditary and non-hereditary chronic pancreatitis. *Gut* 2004; 53: 723-8.
11. Masamune A, Kume K, Shimosegawa T. Differential roles of the *SPINK1* gene mutations in alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 2007; 42 (Suppl 17): 135-40.
12. Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, et al. The N34S mutation of *SPINK1* (*PST1*) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut* 2002; 50: 675-81.
13. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, et al. Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study. International Pancreatitis Study Group. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1467-71.
14. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 1433-7.
15. Wong T, Howes N, Threadgold J, et al. Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. *Pancreatology* 2001; 1: 486-509.
16. Charnley RM. Hereditary pancreatitis. *World J Gastroenterology* 2003; 9: 1-4.

17. Johnson CD, Imrie CW. Pancreatic disease. Towards the Year 2000, Springer Verlag London Limited 1999.
18. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W i wsp. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2006.
19. Jalleh RP, Williamson RCN. Pancreatic exocrine and endocrine function after operations for chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1992; 216: 656-62.
20. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, et al. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA* 2001; 286: 169-70.
21. Johansen D, Borgstrom A, Lindkvist B, et al. Different markers of alcohol consumption, smoking and body mass index in relation to risk of pancreatic cancer. *Pancreatol* 2009; 9: 677-86.
22. Hart AR, Kennedy H, Harvey I. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 275-82.
23. Klein AP, Hruban RH, Brune KA, et al. Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 266-73.
24. Goggins M, Schutte M, Lu J, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 5360-4.
25. Klein A, Brune K, Petersen G, et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 2004; 64: 2634-83.
26. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, et al. Mutations of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1061-4.
27. Schneider A, Pfitzer RH, Barmada MM, et al. Limited contribution of the SPINK1 N34S mutation to the risk and severity of alcoholic chronic pancreatitis: a report from the United States. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1110-5.
28. Truninger K, Witt H, Kock J, et al. Mutations of the serine protease inhibitor, Kazal type 1 gene, in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1133-7.
29. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 265-71.
30. Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation Carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1358-65.
31. Lynch HT. Genetics and pancreatic cancer. *Arch Surg* 1994; 129: 266-8.
32. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 677-85.
33. Spigelman AD, Farmer KCR, James M, et al. Tumours of the liver, bile duct, pancreas and duodenum in a single patient with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1991; 78: 979-80.
34. Su GH, Hruban RH, Bansal RK, et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol* 1999; 154: 1835-40.
35. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 738-44.
36. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut* 2009; 58: 97-103.
37. Lempinen M, Paju A, Kempainen E, 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: 225-30.
38. Piepoli A, Gentile A, Valvano MR. Lack of association between UGT1A7, UGT1A9, ARP, SPINK1 and CFTR gene polymorphisms and pancreatic cancer in Italian patients. *World J Gastroenterol* 2006; 39: 6343-8.
39. Teich N, Schulz HU, Witt H, et al. N34S, a pancreatitis associated SPINK1 mutation, is not associated with sporadic pancreatic cancer. *Pancreatol* 2003; 3: 67-8.
40. Matsubayashi H, Fukushima N, Sato N, et al. Polymorphisms of SPINK1 N34S and CFTR in patients with sporadic and familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 652-5.
41. Ozaki N, Ohmuraya M, Hirota M, et al. Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1572-81.
42. Masamune A, Mizutamari H, Kume K, et al. Hereditary pancreatitis as the premalignant disease: a Japanese case of pancreatic cancer involving the SPINK1 gene mutation N34S. *Pancreas* 2004; 28: 305-10.