

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Andrzej Rafał Hellmann

*Stężenie białka SPINK-1 u chorych
leczonych z powodu przewlekłego
zapalenia trzustki*

GDAŃSK 2016

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor
dr hab. Stanisław Hać, prof. nadzw. GUMed

Medical University of Gdańsk 2016
ISBN 978-83-65098-43-6

Serdecznie dziękuję,

- Prof. Stanisławowi Hać – za inspirację i wsparcie w realizacji pracy
- Prof. Zbigniewowi Śledzińskiemu – za wyrozumiałość i umożliwienie realizacji pracy
- Prof. Marianowi Smoczyńskiemu oraz dr. hab. Krystianowi Adrychowi – za współpracę z Kliniką Gastroenterologii i Hepatologii
- Dr n. med. Iwonię Marek i dr n. med. Justynię Kostro – za pomoc i liczne cenne uwagi
- Dr. hab. Pieterowi Stepaniakowi – za pomoc przy opracowaniu statystycznym wyników
- Prof. Claudio Bassiemu z Werony – za ciepłe przyjęcie i możliwości odbycia stażu w Istituto del Pancreas di Verona oraz cenne uwagi podczas przygotowywania manuskryptu
- Rodzinie – za ciepło, cierpliwość i wyrozumiałość

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
1 WSTĘP	9
1.1 Epidemiologia i etiologia PZT.....	9
1.2 Postacie przewlekłego zapalenia trzustki.....	13
1.2.1 Zapalenie rowkowe trzustki	14
1.2.2 Autoimmunologiczne zapalenie trzustki	15
1.2.3 Zapalenie trzustki związane z mutacjami genetycznymi.	15
1.3 Białko SPINK 1	16
1.4 Diagnostyka przewlekłego zapalenia trzustki.....	18
1.5 Leczenie przewlekłego zapalenia trzustki	19
1.5.1 Leczenie zachowawcze	20
1.5.2 Leczenie endoskopowe.....	21
1.5.3 Leczenie chirurgiczne.....	22
2 CELE PRACY	26
3 MATERIAŁ I METODY	27
3.1 Materiał.....	27
3.1.1 Charakterystyka badanych grup	28
3.2 Metodyka badań.....	29
3.2.1 Oznaczenie stężenia białka SPINK-1:.....	30
3.2.2 Oznaczenie aktywności trypsyny:	31
3.2.3 Oznaczanie aktywności amylazy i lipazy.....	31
3.2.4 Badanie mutacji N34S genu <i>SPINK 1</i> metodą łańcuchowej reakcji polimerazy oraz analizy restrykcyjnej.....	32
3.3 Ocena skuteczności leczenia.....	34
3.4 Analiza statystyczna	34
4 WYNIKI	35
4.1 Określenie mocy testu.....	35

4.2	Stężenie białka SPINK 1.....	35
4.3	Aktywność trypsyny, amylazy i lipazy.....	38
4.4	Ocena nasilenia bólu oraz parametrów odżywienia.....	40
4.5	Badanie mutacji N34S genu <i>SPINK 1</i> w badanej populacji chorych	43
5	DYSKUSJA.....	45
6	WNIOSKI.....	53
7	PIŚMIENICTWO.....	54
8	STRESZCZENIE	62
9	SUMMARY.....	64
10	ANEKS	66

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AIP – *Autoimmune pancreatitis* / Autoimmunologiczne zapalenie trzustki
- CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* / Błonowy regulator przewodnictwa w zwłóknieniu torbielowatym
- CRP – *C-reactive protein* / białko C-reaktywne
- DPPHR – *Duodenal Preserving Pancreatic Head Resection* / Resekcja głowy trzustki z zaoszczędzeniem dwunastnicy
- EBM – *Evidence Based Medicine* / Medycyna oparta o fakty
- ECPW – Endoskopowa Cholangio / Pankreatografia wsteczna
- ERCP – *Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography* / Patrz ECPW
- ESGE – *European Society of Gastrointestinal Endoscopy* / Europejskie Towarzystwo Endoskopowe
- ESWL – *Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy* / Litotrypsja zewnętrzną wiązką ultradźwiękową
- EUS – *Endoscopic Ultrasound* / Endoskopowe badanie ultrasonograficzne
- ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* / test immunoenzymatyczny
- IAT – *islet cel autotransplantation* / autoprzeszczep wysepek trzustkowych
- IPMN – *Intraductal papillary mucinous neoplasm* / Wewnątrzprzewodowy brodawkowo-śluzowy nowotwór trzustki
- MRI – *Magnetic Resonance Imaging* / Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
- sMRCP – *Magnetic resonance cholangiopancreatography with secretin enhancement* / Cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego wzmocniona podaniem sekretyny
- OS – Odchylenie standardowe
- OZT – Ostre Zapalenie Trzustki
- PPPD – *Pylorus Preserving Pancreato-Duodenectomy* / Pankreatoduodenektomia z zaoszczędzeniem odźwiernika.

-
- PanIN – *Pancreatic Intraepithelial lesions* / Zmiany śród nabłonkowe trzustki
- PFT – *pancreatic function testing* / testy czynności trzustki
- PRSSI – *PRoteaSe, Serine 1* / gen kationowego trypsynogenu
- PSTI – *Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor* / Trzustkowy Inhibitor Wydzielania Trypsyny
- PZT – Przewlekłe Zapalenie Trzustki
- PŻW – Przewód Żółciowy Wspólny
- SPINK 1* – *Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1* / Trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny
- SPINK 1** – gen kodujący trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny
- Spink 3* – homologiczny z ludzkim mysi gen kodujący Trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny
- SD – *Santorini duct*
- TK – Tomografia komputerowa
- TATI – *Tumor Associated Trypsin Inhibitor* / Inhibitor Trypsyny związany z nowotworem

*zgodnie z obowiązującą nomenklaturą nazwy genów zapisano kursywą, a nazwę białek bez kursywy.

1 WSTĘP

1.1 Epidemiologia i etiologia PZT

Pierwszy opis przewlekłego zapalenia trzustki powstał najprawdopodobniej w połowie XVIII wieku, a kolejne doniesienia opierające się głównie na badaniach sekcyjnych pojawiły się w kolejnym stuleciu. Współcześnie przewlekłe zapalenie trzustki definiuje się jako chorobę charakteryzującą się nieodwracalnymi zmianami morfologicznymi w postaci postępującego uszkodzenia tkanki zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczej oraz przewodów trzustkowych, z następowym rozwojem tkanki łącznej [11, 69]. Przez wiele lat uważano, że przewlekłe zapalenie trzustki dotyczy głównie pacjentów uzależnionych od alkoholu, u których w pierwszych latach choroby głównym objawem był ból, a w miarę upływu czasu dochodziło do niewydolności egzo- i endokrynej [66]. Dzięki wprowadzeniu nowoczesnych technik diagnostyki obrazowej, patomorfologicznej i molekularnej można było w ostatnich latach wyodrębnić szczególne postaci PZT takie jak zapalenie rowkowe trzustki (*Groove pancreatitis* lub *paraduodenal pancreatitis*), autoimmunologiczne zapalenie trzustki (AIP) czy zapalenie trzustki związane z mutacjami genetycznymi. Aspekty kliniczne i morfologiczne jak i podejście terapeutyczne różni się w zależności od postaci zapalenia.

Dokładną zachorowalność na PZT jest ciężko oszacować, bowiem dotychczas nie powstała wiarygodna epidemiologiczna baza chorych. Opierając się na doniesieniach można powiedzieć, że częstość występowania PZT waha się między 1,6 (np. w przypadku Szwajcarii) a 28 (Japonia) przypadków na 100 tys. mieszkańców rocznie. Problemy z ustaleniem rozpoznania we wczesnej fazie choroby powodują, że trudno ocenić częstość występowania, a dane epidemiologiczne są prawdopodobnie zaniżone.[2, 13, 14, 44].

Z danych epidemiologicznych wynika, że na PZT chorują przede wszystkim mężczyźni w stosunku do kobiet jak 3:1, jednakże dane te wahają się w zależności od typu zapalenia trzustki. Na podstawie japońskich danych epidemiologicznych z 1994 roku, w przypadku mężczyzn 68,5% zachorowań spowodowana była alkoholem, podczas gdy u kobiet zaledwie w 7,6% [44]. Obecnie uważa się, że głównym czynnikiem wywołującym chorobę jest zaburzenie mechanizmu odpływu soku trzustkowego do dwunastnicy (mechanizm obstrukcyjny). Spożycie alkoholu i palenie tytoniu najprawdopodobniej działają w mechanizmie obstrukcyjnym, ponieważ oba te czynniki promują włóknienie mięszu trzustkowego, zwapnienia i tworzenie się złożeń, które w sposób istotny zaburzają prawidłowy

odpływ soku trzustkowego [3]. Nieprawidłowy odpływ może być również spowodowany dysfunkcją zwieracza Odiego, zmianami nowotworowymi w obrębie brodawki Vatera bądź przewodów trzustkowych. Do innych czynników etiologicznych można zaliczyć mutację genetyczną (w genach *SPINK 1*, *CFTR*, *PRSSI*), bądź toczący się proces autoimmunologiczny w mięszu trzustki.

Na przestrzeni lat powstało wiele systemów kwalifikacyjnych zapalenia trzustki. Jeden z pierwszych powstał w 1963 roku podczas Konferencji w Marsylii. W miarę rozwoju diagnostyki obrazowej w kolejnych latach doszło do rewizji poprzednich klasyfikacji i tak w roku 1984 w Cambridge zaproponowano ocenę stopnia zaawansowania choroby na podstawie badań obrazowych [41] (tabela 1). Japońskie Towarzystwo Pankreatologiczne w 1997 r. zaproponowało własną klasyfikację, która opiera się wyłącznie na kryteriach diagnostycznych, nie uwzględniając czynników etiologicznych.

Tabela 1. Kryteria kwalifikacji PZT dla różnych technik obrazowych w oparciu o skalę Cambridge wg Julia Mayerle [48]

Table 1. Evaluation criteria for various diagnostic techniques according to Cambridge classification

Endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna (ERCP)		
Cambridge	0	Bez odchyłeń, całkowita wizualizacja przewodu trzustkowego
	1	Nie więcej niż 3 patologiczne odgałęzienia, przewód Wirsunga w normie
	2	Więcej niż 3 patologiczne odgałęzienia, przewód Wirsunga w normie
	3	Więcej niż 3 patologiczne odgałęzienia, patologia w obrębie przewodu Wirsunga
	4	Jak wyżej, z torbielami, kamienie wewnątrzprzewodowe, zwężenia, zajęcie otaczających organów
Ultrasonografia (USG)		
Cambridge	0	Normalny narząd, przewód < 2 mm, miąższ trzustki jednorodny
	1	Przewód Wirsunga szerokości < 3 mm, powiększenie trzustki (<1,5× normy) miąższ trzustki niejednorodny
	2	Nieregularne zarysy zewnętrzne trzustki, przewód Wirsunga > 3 mm, Zwiększona echogeniczność ścian przewodów trzustkowych
	3	Jak wyżej + torbiele i centralne zwapnienia
	4	Jak wyżej + kamienie w przewodzie, zwężenia, powiększenie narządu > 2-krotne, zakrzepica żyły śledzionowej

Endoskopowa ultrasonografia (EUS)		
Cambridge	0	Bez zmian
	1	Płatowa budowa przypominająca plaster miodu, przewód <3 mm
	2	Hiperechogeniczny przewód, niejednorodne zarysy, przewód <3 mm
	3	Płatowa budowa przypominająca plaster miodu, przewód <3 mm, przegrody, hiperechogeniczne ogniska, nieregularny przewód, bez złożeń.
	4	Jak w 3+ zwapnienia, kamienie, torbiele
Tomografia komputerowa (TK) / cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego (MRCP)		
Cambridge	0	Bez zmian
	1	Nie można zobrazować przy użyciu obecnie dostępnych technik TK i MRI
	2	2 lub więcej z wymienionych odchyleń: Przewód od 2 do 4 mm Nieznaczne powiększenie narządu Niejednorodny miąższ trzustki Niewielkie torbiele Nieregularny przewód trzustkowy Więcej niż 3 patologiczne odgałęzienia
	3	Wszystkie wymienione w Cambridge 2 z przewodem Wirsunga > 4 mm
	4	1 z wymienionych w pkt 2 i 3 patologii + jedna z wymienionych: Obecność dużych torbieli >10 mm Zwapnienia miąższu Ubytki wypełnienia światła przewodów trzustkowych lub stwierdzenie kamieni w przewodach trzustkowych Niedrożność przewodów trzustkowych, ich zwężenie lub znacznego stopnia nieregularność przebiegu

Dwie najnowsze klasyfikacje powstały w 2001 roku (TIGAR-O) oraz w 2007 (M-ANNHEIM) uwzględniają one przede wszystkim etiologię PZT [13]. Obie zakładają wieloczynnikowy charakter choroby [14]. Nadużywanie alkoholu w wielu przypadkach nie prowadzi do rozwinięcia choroby, potrzeba jeszcze dodatkowych czynników etiologicznych, takich jak: palenie papierosów, występowanie mutacji genetycznej czy nieprawidłowości anatomicznych. Zaproponowany system kwalifikacji podzielono na 6 głównych grup (tabela 2).

Tabela 2. Klasyfikacja czynników ryzyka PZT- TIGAR-O wg etiologii [17]
 Table 2. TIGAR-O risk factor classification

PRZYCZYNY	CZYNNIKI SPRAWCZE
TOKSYCZNE (T)	alkohol palenie tytoniu hyperklacemia (nadczynność przytarczyc) hyperlipidemia przewlekła niewydolność nerek (PNN) leki (fenacetyna) toksyny (związki organiczne)
IDIOPATYCZNE (I)	wczesnym początku objawów < 35 r.ż o późnym początku objawów > 35 r.ż. tropikalne zwapniające zapalenie trzustki
GENETYCZNE (G)	Mutacje: PRSS1 CFTR SPINK1 Inne
AUTOIMMUNOLOGICZNE (A)	izolowane autoimmunologiczne zapalenie trzustki IgG4 zależne i niezależne. zapalenie trzustki jako komponent zespołu autoimmunologicznego
NAWRACAJĄCE OSTRE ZAPALENIA TRZUSTKI (R)	przebyte ciężkie, martwicze OZT nawracające OZT niedokrwienie i choroby naczyń zaopatrujących trzustkę popromienne
ZAPOROWE (O)	trzustka dwudzielna zaburzenia funkcji zwieracza Oddiego zwężenie przewodu Wirsunga torbiele ściany dwunastnicy urazowe uszkodzenia przewodu trzustkowego

Sześć lat później powstała podobna klasyfikacja, która podkreśla złożoność etiologii przewlekłego zapalenia trzustki. W klasyfikacji tej bieżą się pod uwagę 7 głównych grup czynników predysponujących do powstania choroby oraz dodatkową cechę **M** (multiple) wskazującą na możliwość współistnienia poszczególnych czynników.

Tabela 3. Klasyfikacja M-ANNHEIM [65]

Table 3. M-ANNHEIM classification

M-ANNHEIM	
<i>Multiple risk</i> / wieloczynnikowość:	
<i>Alcohol consumption</i> / Alkoholizm	Nadmierne > 80 g/d Zwiększone 20-80 g/d Umiarkowane <20 g/d
<i>Nicotine consumption</i> / Nikotynizm	
<i>Nutritional factors</i> / Dieta	Duże ilości białka i tłuszczu w diecie Hiperlipidemia
<i>Hereditary factors</i> / Czynniki dziedziczne	Dziedziczne, rodzinne, idiopatyczne (wczesny lub późny początek) tropikalne zapalenie trzustki.
<i>Efferent pancreatic duct factors</i> / Zaburzenia odpływu z przewodów trzustkowych	trzustka dwudzielna, zaburzenia funkcji zwieracza Oddiego, zwężenie przewodu Wirsunga, torbiele ściany dwunastnicy, urazowe uszkodzenia przewodu trzustkowego
<i>Immunological factors</i> / Czynniki immunologiczne	Autoimmunologiczne zapalenie trzustki
<i>Miscellaneous and Metabolic factors</i> / Metaboliczne i niesklasyfikowane powyżej	Hiperkalcemia, nadczynność przytarczyc, przewlekła niewydolność nerek, leki, toksyny

W ramach klasyfikacji M-ANNHEIM stworzono punktację celem oceny stopnia zaawansowania choroby. Pod uwagę bierze się: ból (zgłaszany przez pacjenta), kontrolę farmakologiczną bólu, przebyte zabiegi chirurgiczne, niewydolność zewnątrz i wewnątrz- wydzielniczą trzustki, zmiany morfologiczne trzustki (w oparciu o skalę Cambridge) oraz ciężkie powikłania PZT. Dzięki zsumowaniu punktów można oszacować stopień zaawansowania choroby [65].

1.2 Postaci przewlekłego zapalenia trzustki

Przewlekłe zapalenie trzustki przez wiele lat było uważane za chorobą spowodowaną przez alkohol i klinicznie charakteryzującą się dolegliwościami bólowymi w początkowym okresie i dysfunkcją zewnątrz i wewnątrz-wydzielniczą w

zaawansowanym stadium. Obecnie wiadomo, że PZT jest chorobą bardziej złożoną i niejednorodną. Przebieg kliniczny, diagnostyka i podejście terapeutyczne jest różne w zależności od postaci.

1.2.1 Zapalenie rowkowe trzustki

Zapalenie rowkowe trzustki (*Groove pancreatitis, paraduodenal pancreatitis*) klinicznie prezentuje się przez: ból w nadbrzuszu, spadek masy ciała, wymioty po posiłku, nieco rzadziej występują biegunka i żółtaczka. Istotnym problemem klinicznym jest fakt iż choroba ma podobne objawy jak rak głowy trzustki, może go upodabniać, ale może też współwystępować [79]. Jest to szczególna postać zapalenia trzustki; pierwszy opis przypadku pojawił się w 1973 w Niemczech. Etiologia choroby jest słabo udokumentowana a występowanie jest dość rzadkie, choć uważa się, że wynika to z małej rozpoznawalności. Ta postać PZT najczęściej dotyczy mężczyzn i jest silnie związana z nadużywaniem alkoholu oraz paleniem papierosów [43]. Na podstawie materiałów sekcyjnych pacjentów cierpiących na PZT opisano zmiany torbielowate w dwunastnicy, umiejscowione w błonie podśluzowej lub mięśniowej na odcinku między odźwiernikiem a brodawką dwunastniczą większą, które powodują zwężenie światła dwunastnicy, oraz utrudniają odpływ soku trzustkowego [72]. Jako mechanizm powstania zapalenia podaje się odwrócenie przepływu soku trzustkowego przez przewód trzustkowy dodatkowy (SD); sok trzustkowy płynie z przewodu Santoriego do przewodu Wirunga powodując akumulację i wzrost ciśnienia soku trzustkowego w głowie gruczołu. Predysponuje to do tworzenia pseudotorbieli i wycieku soku trzustkowego do anatomicznego rowka (*Groove*) – między głową trzustki, dwunastnicy i przewodem żółciowym. W związku z tym w okolicy głowy trzustki tworzy się odczyn zapalny. Morfologicznie wyróżnia się 2 formy choroby: torbielowatą charakteryzującą się obecnością małych torbieli położonych śródściennie w dwunastnicy (dotyczy ona 75% przypadków) oraz rzadszą formę litą. Najdokładniejszym narzędziem diagnostycznym w tej postaci są badania EUS oraz MRI [6].

Obecnie uważa się, że najskuteczniejszą metodą leczenia *groove pancreatitis* jest pankreatoduodenektomia [6, 61].

1.2.2 Autoimmunologiczne zapalenie trzustki

Może mieć przebieg bezobjawowy lub charakteryzować się wieloma objawami takim i jak żółtaczka, bóle brzucha, spadek masy ciała oraz objawy związane z zajęciem innych narządów m.in. nerek, wątroby, pęcherzyka żółciowego, ślinianek bądź szpiku kostnego. W polskiej nomenklaturze naukowej występuję pod wieloma nazwami jak np.: pierwotne przewlekłe zapalenie trzustki, limfoplazmatyczne stwardniające zapalenie trzustki, ziarniniakowe zapalenie trzustki czy niealkoholowe PZT z destrukcją przewodów. Częstość tej choroby szacuje się na 5% wszystkich przypadków PZT. Średnia wieku chorych wynosi 55 lat z dwukrotną przewagą płci męskiej. Przeciwciała klasy IgG4 stanowi ok. 3-6% całkowitej ilości surowiczej IgG. Wykazuje ono właściwości przeciwzapalne, jego stężenie w stanie fizjologicznym jest stabilne, a jego podwyższenie uważane jest za marker specyficzny dla autoimmunologicznego zapalenia trzustki. U 40-60% pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem trzustki obserwuje się obecność IgG4 w naciekach tkankowych i/lub surowicy i jest to tzw. typ 1- LPSP (lymphoplasmatic sclerosing pancreatitis) czyli limfoplazmatyczne stwardniające PZT. Forma IgG4 pozytywna, często obejmuje inne narządy. Postać ta wykazuje dużą tendencję do nawrotów. Ponadto wyróżnia się typ 2 – IDCP (*idiopathic duct centric pancreatitis*) czyli zapalenie trzustki obejmujące głównie przewody trzustkowe. Ta z kolei forma jest IgG4 negatywna, i jest związana z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i małą tendencją do nawrotów. Istnieje wiele kryteriów diagnostycznych AIP, jednym z częściej używanych jest HISOR-t zaproponowane przez Mayo Clinic – opierające się o 5 elementów diagnostycznych takich jak: badanie histopatologiczne biopsji trzustki, obrazowanie, serologię, zajęcie dodatkowych narządów i odpowiedź na leczenie [19]. Zarówno typ 1 i 2 dobrze odpowiadają na leczenie immunosupresyjne, w pierwszej kolejności glikokortykosteroidami [25]. Jednakże z uwagi na rzadkie występowanie choroby i nie uwzględnianie tej postaci w diagnostyce różnicowej powoduje, że często pacjenci przechodzą niepotrzebne leczenie chirurgiczne bądź endoskopowe.

1.2.3 Zapalenie trzustki związane z mutacjami genetycznymi

W ostatnich latach zgromadzono wiele danych potwierdzających rolę mutacji genetycznych, które mogą przyczyniać się do rozwoju PZT. W roku 1996 została

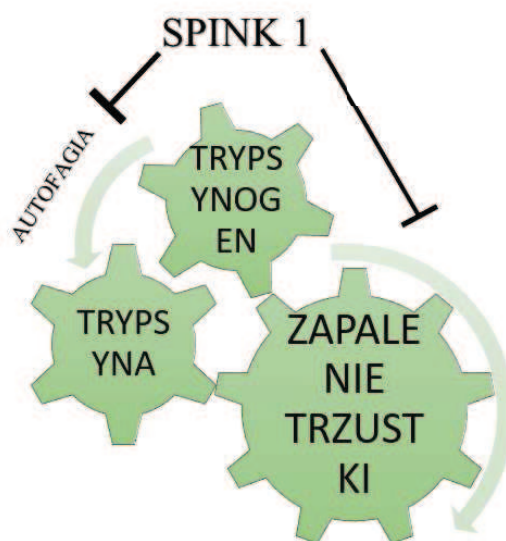
zidentyfikowana mutacja genu *PRSSI* kodującego kationowy trypsynogen i udowodniono jej związek z rozwojem tzw. dziedzicznego zapalenia trzustki [77]. Białko PRSS1 odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności trypsyny. Zidentyfikowano także inne mutacje genetyczne odpowiedzialne za występowanie lub predyspozycję do zachorowania. Wśród nich należy wymienić mutacje w genie *CFTR* zidentyfikowaną w 1989 jako odpowiedzialną za powstanie mukowiscydozy. Wykazano, że obecność mutacji *CFTR* jest czynnikiem predysponującym do rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki [64, 67]. Kolejnym ważnym odkryciem, opublikowanym w 2000 roku przez Witt i wsp. było zidentyfikowanie mutacji w genie kodującym *SPINK-1* (*serine protease inhibitor, Kazal type 1*, określonego również jako *pancreatic secretory trypsin inhibitor – PSTI*) oraz wykazanie jej związku z przewlekłym zapaleniem trzustki [78].

1.3 Białko SPINK 1

Gen kodujący białko SPINK 1 znajduje się na 5 chromosomie. Obecnie znanych jest ok 40 wariantów mutacji genu *SPINK1*, najczęściej spotykany jest wariant N34S. Istnieje wiele dowodów wskazujących na istotną rolę trzustkowego inhibitora wydzielania trypsyny w patogenezie PZT [78]. Białko SPINK-1 zostało odkryte jako inhibitor aktywności trypsyny przez Kazala i wsp. w 1948 roku [35]. Od tego czasu nie słabnie zainteresowanie tym białkiem. Białko SPINK 1 składa się z 79 aminokwasów i jest wytwarzane w komórkach zrazikowych trzustki. Jest produkowane razem z trypsynogenem i innymi enzymami trawiennymi. Jego podstawową funkcją jest łączenie się z nadmiernie aktywowaną trypsyną i tworzenie stabilnego, nieaktywnego kompleksu [46]. Pozwala to na unieczynnienie ok. 20% aktywnej trypsyny. Białko to stanowi zatem jedną z barier chroniących przed samotrawieniem komórek pęcherzykowych trzustki [47]. Ponadto udowodniono, że białko SPINK 1 zalicza się do tzw. białek ostrej fazy – grupy białek surowicy syntetyzowanych przez wątrobę, których stężenie zmienia się w wyniku odpowiedzi na stan zapalny. Najprawdopodobniej wątroba jest najważniejszym pozatrzustkowym miejscem syntezy SPINK 1, nie jest to jednak czuły wskaźnik zapalny ponieważ jego surowiczy poziom zaczyna wzrastać dopiero gdy białko CRP osiągnie surowiczy poziom 50-100 mg/L [58]. Od czasu odkrycia białka SPINK 1 bardzo poszerzyła się wiedza na jego temat. W latach 80. ubiegłego stulecia przy

okazji prowadzonych badań nad rakiem jajnika zostało odkryte białko TATI (*tumor associated trypsin inhibitor*), które ma identyczną strukturę jak wcześniej poznane białko SPINK 1/ PSTI [28].

Celem lepszego poznania jego funkcji naukowcy japońscy stworzyli model myszy z homologicznym do ludzkiego białkiem Spink3. Badania te wykazały rolę białka SPINK 1 w procesie autofagii – polegającym na dostarczaniu elementów cytoplazmatycznych do lizosomów. W przypadku zapalenia trzustki zaobserwowano, że proces autofagii prowadzi do aktywacji trypsyny poprzez dostarczanie trypsynogenu do lizosomów. U myszy pozbawionych genu *Spink3* dochodziło do niepożądanego procesu autofagii [53]. Uważa się, że białko SPINK wykazuje działanie ochronne w zapaleniu trzustki przez podwójne działanie: jako bezpośredni inhibitor trypsyny oraz przez, hamowanie procesu autofagii [22, 52, 75].



Ryc. 1. Model ochronnego działania białka SPINK-1 w mechanizmie zapalenia trzustki. Podwójne działanie ochronne białka SPINK-1: bezpośrednie hamowanie aktywnej trypsyny, oraz regulowanie procesu autofagii odpowiedzialnego za aktywację trypsynogenu
 Fig. 1. Model of protective role of SPINK 1 protein in the mechanism of pancreatitis. A double protection obtained by direct inhibition of trypsin activity, and by controlling autophagy which is responsible for trypsinogen activation

1.4 Diagnostyka przewlekłego zapalenia trzustki

Diagnostyka przewlekłego zapalenia trzustki oparta jest przede wszystkim o badania obrazowe. Najczęściej chorobę rozpoznaje się już w zaawansowanym stadium. Postawienie rozpoznania PZT wymaga dokładnego badania klinicznego, potwierdzenia w badaniach obrazowych oraz niekiedy na podstawie parametrów biochemicznych. Do diagnostyki rutynowo wykorzystuje się: tomografię komputerową (TK) jamy brzusznej, ultrasonografię endoskopową (EUS), cholangiopankreatografię rezonansu magnetycznego (MRCP), endoskopową cholangiopankreatografię wsteczną (ERCP) oraz rzadziej ultrasonografię jamy brzusznej (USG) lub badania histopatologicznego wycinka pobranego z trzustki pod kontrolą badań obrazowych (EUS, TK) lub w trakcie interwencji chirurgicznej. Uchwycenie choroby we wczesnym stadium jest o tyle trudne, że może ona być niema klinicznie i dostępne badania obrazowe mogą nie wykazywać typowych zmian dla PZT.

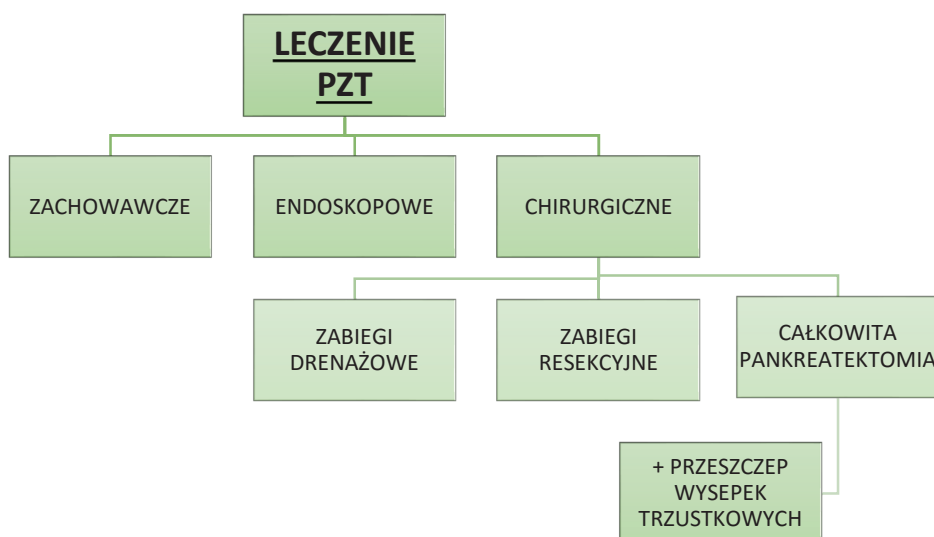
Dostępne dane sugerują wysoką czułość testów czynności trzustki (PFT) w diagnostyce wczesnych zmian [23]. W ostatnim retrospektywnym badaniu na podstawie analizy 116 pacjentów poddanych PFT, określono czułość metody na 82% a swoistość na 86% [37]. Problemem jest mała dostępność, która wynika również z faktu konieczności pobierania materiału drogą endoskopii lub specjalnego zgłębnika. Obecnie tylko parę ośrodków w Stanach Zjednoczonych stosuje tą metodę.

Najnowsze doniesienia wskazują przeważającą rolę badania EUS we wczesnym wykrywaniu PZT. W 2007 stworzono tzw. kryteria Rosemont (duże i małe), które pozwalają zakwalifikować obraz endoultrasonograficzny trzustki jako: odpowiadający rozpoznaniu PZT, sugerujący rozpoznanie, nie pozwalający na rozpoznanie, prawidłowy [7]. Badanie EUS jest zależne od osoby je wykonującej i jego dokładności; najnowsze doniesienia oceniające retrospektywnie pracę endoskopistów wskazują, na małą powtarzalność badań oraz dużą rozbieżność między osobami wykonującymi badanie [20]. Wskazuje to na konieczność szkolenia oraz poprawę jakości wykonywanych badań EUS. Dodatkowo pomocne w diagnostyce EUS może być zastosowanie elastografii bądź kontrastu (CEBMI i CEHMI) [29].

Kolejnym narzędziem służącym do postawienia wczesnego rozpoznania może być stosowanie sekretyny w trakcie badania MRI oraz jeszcze nowszych technik takich jak spektroskopii lub znaczników spinowych, które pozwalają na obrazowanie przepływu soku trzustkowego [73].

1.5 Leczenie przewlekłego zapalenia trzustki

Leczenie PZT jest w dalszym ciągu dużym wyzwaniem, ponieważ jak dotąd nieznane jest leczenie przyczynowe, a jedynie objawowe, które głównie skupia się na zmniejszeniu dolegliwości bólowych, spowolnieniu procesu chorobowego, wspomaganiu funkcji zewnętrznej i wewnętrzwydzielniczej. Wyjątkiem jest tu AIP, w przypadku którego stosowanie glikokortykoidów lub innych leków immunosupresyjnych może doprowadzić do pełnego wyleczenia [25].



Ryc. 2. Schemat przedstawiający strategie postępowania u chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki

Fig. 2. Treatment strategy for patients with chronic pancreatitis

Tabela 4. Klasyfikacja z Werony pomocna w wyborze metody leczniczej w zależności od etiologii PZT [18]

Table 4. Verona classification, indicating treatment strategy based on etiology of chronic pancreatitis

Typ zapalenia trzustki	Metoda lecznicza
Związane z dysfunkcją zwieracza Oddiego	ENDOSKOPIA
Autoimmunologiczne	ZACHOWAWCZE (IMMUNOSUPRESJA)
Zapalenie rowka (Groove pancreatitis)	CHIRURGIA
Związane z mutacjami genetycznymi	ENDOSKOPIA/ CHIRURGIA
Związana z anomaliami anatomicznymi	ENDOSKOPIA
Wtórna do martwicy trzustkowej	ENDOSKOPIA/ CHIRURGIA
Idiopatyczne	ENDOSKOPIA/ CHIRURGIA

Istnieją trzy główne strategie postępowania u chorych z PZT, które przedstawiono na ryc. 2. Przy podejmowaniu decyzji o wyborze metody leczenia niezmiernie istotna jest znajomość formy zapalenia z jakim mamy do czynienia. Naukowiec z Werony zaproponowali klasyfikację (tabela 4), na podstawie której można podjąć decyzję o najbardziej odpowiednim u konkretnego chorego postępowaniu.

1.5.1 Leczenie zachowawcze

Przez leczenie zachowawcze rozumie się, modyfikację stylu życia, abstynencję alkoholową, zaprzestanie palenia oraz prawidłowe nawyki żywieniowe. Równie ważne jest farmakologiczne leczenie bólu. W pierwszej kolejności podaje się nieopiodowe leki przeciwbólowe, do których w razie braku skuteczności należy dodawać kolejno tzw. słabe analgetyki opiodowe (np. tramadol), a w późniejszym etapie, mocne (morfina) wg tzw. drabiny analgetycznej WHO. Ponadto pacjentom podaje się preparaty enzymów trzustkowych, opiera się to na teorii ujem-

nego sprzężenia zwrotnego: podaż enzymów trzustkowych przez pobudzenie receptorów jelitowych wymusza ujemne sprzężenie zwrotne i wyhamowanie sekrecji trzustkowej, a tym samym zmniejszenie ciśnienia w PW co ma powodować zmniejszenie dolegliwości bólowych [50]. Brak jednak jednoznacznych dowodów potwierdzających tą teorię. Szczególną formą leczenia zachowawczego jest leczenie immunosupresyjne w przypadku autoimmunologicznego zapalenia trzustki.

1.5.2 Leczenie endoskopowe

W przypadku znacznych dolegliwości bólowych leczenie endoskopowe powinno być rozpoczęte tak wcześnie jak to możliwe. Dobre efekty daje połączenie tej techniki z litotrypsją mechaniczną złożeń trzustkowych za pomocą pozaustrojowej fali uderzeniowej (ESWL) zwłaszcza gdy mamy do czynienia z obecnością dużych (> 4 mm) kamieni w przewodzie Wirsunga. Najlepszymi kandydatami do leczenia endoskopowego są pacjenci ze złożami wewnątrzprzewodowymi powodującymi blok odpływu soku trzustkowego oraz ze zwężeniami przewodu trzustkowego [9]. Protezowanie przewodu trzustkowego powinno być kontynuowane przez 6–12 miesięcy po ustąpieniu dolegliwości bólowych [30]. Jeśli chodzi o kwestie częstości wymiany protez, to obecnie uważa się, że właściwsza jest ich wymiana w przypadku zaistnienia konieczności (nawrót dolegliwości bólowych, poszerzenie PW) niż regularna wymiana np. co 3 miesiące. Wynika to z faktu, że skuteczność i długość funkcjonowania protez jest trudna do przewidzenia i często mimo upływu 3 miesięcy proteza nadal spełnia swoją funkcję. Nie należy jednak przekraczać okresu 8-12 miesięcy gdyż może to powodować powikłania [16].

Dużym wyzwaniem w leczeniu PZT jest moment decyzji o zakończeniu leczenia endoskopowego i rozważenie postępowania chirurgicznego. Aktualne wytyczne zalecają podejście operacyjne w przypadku [18, 50]:

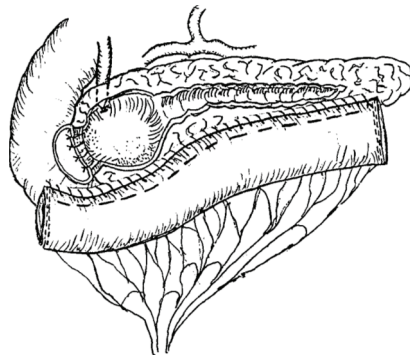
- Technicznej niemożności kontynuowania endoterapii
- Niezadawalającego efektu klinicznego leczenia po upływie 6-8 tygodni od rozpoczęcia endoterapii.
- Braku odpowiedniego odpływu soku trzustkowego z przewodu Wirsunga
- Niedrożności dwunastnicy lub dróg żółciowych z powodu powiększonej masy głowy trzustki
- Objawowej masy zapalnej w głowie trzustki

1.5.3 Leczenie chirurgiczne

Celem leczenia chirurgicznego powinno być: doprowadzenie do dobrej kontroli bólu, zminimalizowania użycia środków przeciwbólowych, zwłaszcza opioidowych, zaoszczędzenie jak największej ilości tkanki trzustkowej z zachowaną funkcją zewnątrz i wewnątrzwydzielniczą, oraz poprawa jakości życia [30]. Chirurgiczne leczenie PZT obejmuje:

- **Operacja drenażowa- sposobem Puestow w modyfikacji Partington-Rochelle**

Polega na podłużnym rozcięciu głównego przewodu trzustkowego na odcinku minimum 6 cm około 1-2 cm od śledziony oraz 1 cm od dwunastnicy. Po rozcięciu przewodu należy usunąć z jego światła ewentualne złoże. Następnie nacięty przewód trzustkowy zespara się z pętlą jelita cienkiego w taki sposób aby szwy przechodziły przez mięśń trzustki tuż przy brzegu przewodu trzustkowego (ryc. 3).

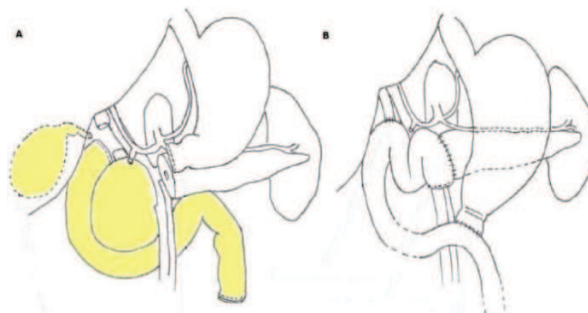


Ryc. 3. Zespolenie jelitowo-trzustkowe w operacji sposobem Puestowa (własność Instituto del Pancreas di Verona udostępniono za zgodą prof. Claudio Bassiego)

Fig. 3. Pancreaticojejunostomy modo Puestow (owned by Istituto del Pancreas di Verona with the permission of prof. Claudio Bassi)

- **Resekcja głowy lub ogona trzustki (pankreato-duodenektomia, obwodowa resekcja trzustki)**

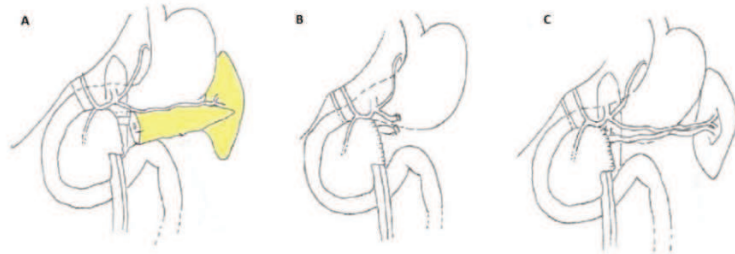
Operację usunięcia głowy trzustki wraz z dwunastnicą wykonuje się w przypadku zapalenia rowkowego trzustki (*paraduodenal pancreatitis*) lub z powodu podejrzenia zmiany złośliwej. Technicznie operacja wykonywana jest w sposób podobny jak w przypadku zabiegu z przyczyn onkologicznych z tą różnicą, że można zachować odźwiernik (PPPD) i początkowy fragment dwunastnicy. Najczęściej stosuje się modyfikację Traverso (ryc. 4).



Ryc. 4. Resekcja głowy trzustki wraz z dwunastnicą z zaoszczędzeniem odźwiernika, żółtym kolorem oznaczono obszar resekcji (własność Istituto del Pancreas di Verona udostępniono za zgodą prof. Claudio Bassiego)

Fig. 4. Pylorus Preserving Pancreato-Duodenectomy yellow – resected area (owned by Istituto del Pancreas di Verona with the permission of prof. Claudio Bassi)

Obwodowa resekcja trzustki jest wskazana w przypadku podejrzenia zmiany złośliwej oraz istotnego zwężenia przewodu trzustkowego w ogonie trzustki. Operacja ta jest rzadko wykonywana z powodu często obserwowanej niewydolności trzustki. Technicznie operacja polega na resekcji ogona i części trzonu trzustki z zachowaniem bądź nie śledziony (ryc. 5).

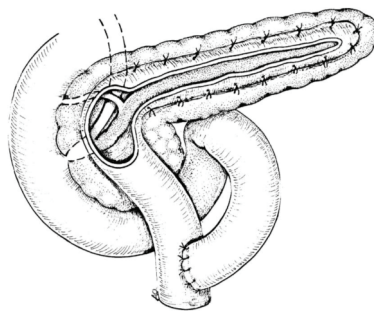


Ryc. 5. Dystalna resekcja trzustki B. ze śledzioną C. z zaoszczędzeniem śledziony, żółtym kolorem oznaczono obszar resekcji (własność Istituto del Pancreas di Verona udostępniono za zgodą prof. Claudio Bassiego)

Fig. 5. Distal pancreatectomy B. with splenectomy C. spleen preserving yellow – resected area (owned by Istituto del Pancreas di Verona with the permission of prof. Claudio Bassi)

- **Połączenie operacji drenażowej i resekcji (tzw. grupa resekcji głowy trzustki z zaoszczędzeniem dwunastnicy – DPPHR)**

Operacja sposobem Frey'a jest to zabieg drenażowo-resekcyjny, polegający na podłużnym nacięciu głównego przewodu trzustkowego z jednoczesną resekcją guza zapalnego głowy trzustki w kształcie litery V (w granicach wyznaczonych przez tylne ściany przewodów trzustkowych biegnących z wyrostka haczykowatego trzustki oraz przewodu Santoriego). W trakcie zabiegu usuwa się również złoży z przewodu Wirsunga. Rekonstrukcję wykonuje się przez przysycie pętli jelitowej do mięszu trzustki (ryc. 6).

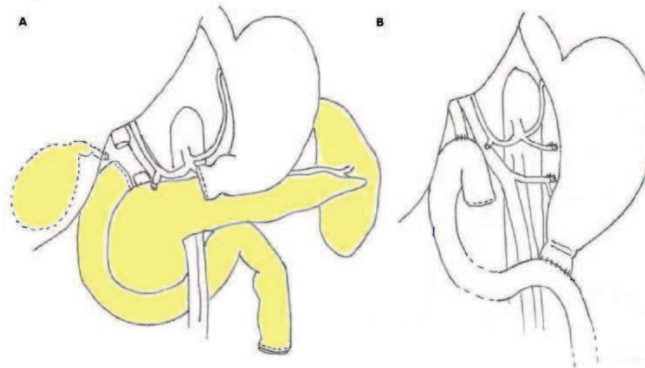


Ryc. 6. Operacja sposobem Frey'a (własność Istituto del Pancreas di Verona udostępniono za zgodą prof. Claudio Bassiego)

Fig. 6. Frey's procedure (owned by Istituto del Pancreas di Verona with the permission of prof. Claudio Bassi)

- **Całkowite usunięcie trzustki z autoprzeszczepieniem wysepek trzustkowych (IAT)**

Jest to najbardziej radykalne postępowanie w przypadku PZT, a kwalifikacja do procedury jest bardzo restrykcyjna. Wydaje się, że najlepszymi kandydatami do tego typu procedury są pacjenci cierpiący na PZT o podłożu genetycznym, u których objawy choroby i niewydolności trzustki pojawiają się na wczesnym etapie, a ryzyko rozwinięcia raka trzustki jest 50 razy większe niż populacji ludzi zdrowych [27]. Zabieg polega na całkowitym wycięciu trzustki wraz ze śledzioną i częścią dwunastnicy (ryc. 7) z odtworzeniem ciągłości przewodu pokarmowego i zespoleniem żółciowo-jelitowym na pętli Roux-en-Y. Największym wyzwaniem w trakcie operacji jest zachowanie ukrwienia trzustki aż do całkowitej mobilizacji narządu przed ostatecznym wycięciem oraz zminimalizowanie okresu ciepłego niedokrwienia tak, aby maksymalnie wydłużyć żywotności wysepek trzustkowych [8]. Po uzyskaniu narządu izoluje się wysepki trzustkowe, które następnie podaje się do krążenia wrotnego, najczęściej przez kikut żyły śledzionowej. Procedurę wykonuje się po uprzednim podaniu heparyny, aby zmniejszyć ryzyko zakrzepicy w krążeniu wrotnym.



Ryc. 7. Całkowite usunięcie trzustki wraz ze śledzioną, żółtym kolorem oznaczono obszar resekcji (własność Insituto del Pancreas di Verona udostępniono za zgodą prof. Claudio Bassiego)

Fig. 7. Total pancreateosplenectomy. yellow- resected area (owned by Istituto del Pancreas di Verona with the permission of prof. Claudio Bassi)

2 CELE PRACY

W świetle przedstawionych danych można stwierdzić, że w ostatnich latach nastąpił znaczący postęp zarówno w diagnostyce jak i w leczeniu przewlekłego zapalenia trzustki. W diagnostyce zawdzięczamy to głównie rozwojowi i dostępności badań obrazowych, a w leczeniu rozwojowi technik endoskopowych i chirurgicznych. Stosowane systemy kwalifikacji w praktyce klinicznej mają na celu ocenę stopnia zaawansowania choroby ciągle obarczone są dużą dozą subiektywizmu zarówno chorego jak i lekarzy. Oznaczanie dostępnymi metodami aktywności enzymów trzustkowych (lipazy, amylazy, elastazy) również nie dostarcza przekonujących danych dla oceny stopnia zaawansowania choroby czy wyboru właściwej metody leczenia.

Dzięki coraz szerszej poznawanej roli białka SPINK 1 w fizjologii i patologii trzustki postanowiono oznaczać białko SPINK 1 oraz aktywność trypsyny u chorych z rozpoznaniem PZT w momencie zakwalifikowania do leczenia chirurgicznego bądź endoskopowego oraz po 6 miesiącach leczenia. Badania takie nie były dotychczas podejmowane. Z analizy postanowiono wyłączyć chorych, u których stwierdzono obecność mutacji N34S genu *SPINK 1*.

W pracy postawiono sobie następujące cele badawcze:

1. Czy oznaczenie stężenia białka SPINK 1 może być dodatkowym parametrem ułatwiającym wybór właściwej metody leczenia; chirurgicznej bądź endoskopowej.
2. Czy oznaczanie stężenia białka SPINK 1 może być parametrem potwierdzającym skuteczność zastosowanego leczenia.

3 MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Endokrynologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Katedrze i Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Protokół badawczy uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym /NKBBN/489/2012-2013/. Wszyscy chorzy zostali poinformowani o celu badania i do analizy zostali włączeni jedynie ci, którzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. W trakcie zbierania danych przestrzegano procedur ochrony danych osobowych, zgodnie z obowiązującą ustawą.

3.1 Materiał

Do badania włączono 58 chorych z rozpoznaniem PZT. Celem wyłonienia jednolitych grup badanych zastosowano następujące kryteria włączenia i wyłączenia:

Kryterium włączenia:

1. Potwierdzone rozpoznanie PZT (wywiad, badanie kliniczne, badania obrazowe)
2. Kwalifikacja do leczenia inwazyjnego (chirurgicznego lub endoskopowego)
3. Brak mutacji N34S genu *SPINK1*

Kryterium wyłączenia:

1. Wcześniej przebyte urazy i zabiegi operacyjne w obrębie trzustki
2. Wcześniej przebyte zabiegi przeciwbólowe (splanchnectomia, alkoholizacja splotu trzewnego)
3. Mutacja N34S w genie *SPINK1*

Z badanej populacji wyodrębniono 2 grupy. Grupa A (n=30) pacjenci leczeni chirurgicznie obu płci w wieku powyżej 18 lat (kobiety stanowiły 20% populacji badanej, a mężczyźni 80%). Grupa B kontrolna (n=28) poddani pierwszorazo-

wemu zabiegowi endoskopowemu obu płci w wieku powyżej 18 lat (kobiety stanowiły 21% populacji badanej, a mężczyźni 79%). Rozpoznanie PZT ustalano na podstawie objawów klinicznych, badań laboratoryjnych oraz badań obrazowych.

3.1.1 Charakterystyka badanych grup

Tabela 5. Struktura demograficzna badanych grupach

Table 5. Characteristics of the study population

	GRUPA A (leczenie chirurgiczne)	GRUPA B (leczenie endoskopowe)	P
Liczebność	30	28	
Średni wiek	55,03 ($\pm 7,7$)	55,8 ($\pm 9,3$)	0,726
Płeć K/M	6/24 20%/80%	6/22 21%/79%	
Długość wywiadu PZT	5,23 ($\pm 5,49$)	4,68 ($\pm 4,97$)	0,694
BMI w chwili rozpoczęcia leczenia	21,11 ($\pm 2,77$)	21,97 ($\pm 3,46$)	0,298
Etiologia alkoholowa	24 (80%)	22 (78%)	0,895
Etiologia żółciopochodna	5 (16%)	3 (10%)	

Tabela 6. Porównanie grup pod względem niewydolności zewnątrz i wewnątrz wydzielniczej trzustki, nikotynizmu, nasilenia dolegliwości bólowych wyrażonej w skali VAS oraz występowania mutacji N34S

Table 6. Characteristics and comparison of the patients in terms of endo and exocrine insufficiency, nicotine addiction, pain score (VAS) and N34S mutation

	GRUPA A (leczenie chirurgiczne)	GRUPA B (leczenie endoskopowe)	p
Cukrzyca	10 (33%)	7 (25%)	0,345
Biegunki	14 (46%)	15 (53%)	0,606
Nikotynizm	28 (93%)	20 (71%)	0,368
Obecność silnego bólu (wg. Skali VAS.)	6,3 ($\pm 2,89$)	5,89 ($\pm 1,42$)	0,437
Mutacja N34S	1 (3%)	1 (3,5%)	

3.2 Metodyka badań

Materiał (krew obwodowa) pobierano od pacjentów przed planowanym zabiegiem w dniu przyjęcia na oddział, a następnie po 6 miesiącach w trakcie wizyty kontrolnej. Krew pobierano do dwóch probówek. Pierwsza z żelem separującym (tzw. „na skrzep”) celem oznaczenia stężenia białka SPINK 1, aktywności amylazy, lipazy oraz trypsyny, po ok. 30-minutowym odstawieniu w temperaturze pokojowej, krew była odwirowywana przez 20 minut z prędkością 1500×g zgodnie z zaleceniem producenta (USCN Life Science Inc, USA). Następnie surowicę odpipetowywawno do dwóch probówek przeznaczonych do mrożenia (do -80 °C).

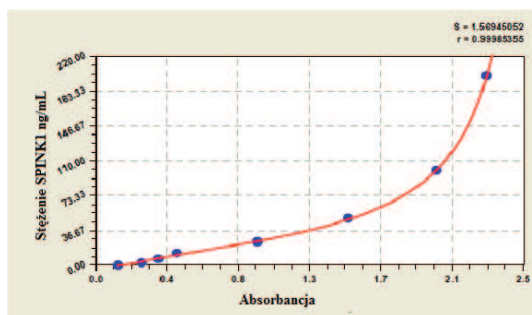
Drugą próbkę do badania krwi pełnej z EDTA zabezpieczano w celu wykonania badania na obecność mutacji N34S. W ten sposób uzyskane próbki mrożono w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1 Oznaczenie stężenia białka SPINK-1

Oznaczenie stężenia białka SPINK-1 w surowicy zostało przeprowadzone za pomocą testu podwójnego wiązania ELISA z wykorzystaniem komercyjnego Human ELISA Kit for SPINK1 (USCN Life Science Inc. USA). Wartość referencyjna stężenia w surowicy wynosi $2,86\text{--}22,62\text{ ng/mL}$. ELISA – jest techniką immunochemiczną, wykorzystującą wiązanie antygenów do polisterynowych mikropłytek i ich wykrywanie za pomocą przeciwciał znakowanych przez enzymy. Oznaczenia stężenia białka SPINK-1 zostały wykonywane przy użyciu automatu do metod ELISA DX2 firmy DYNEX Technologies, w którym wykonywane są następujące etapy:

- Przygotowanie odczynników i badanych próbek; ogrzanie do temp $18\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$, odwirowanie oraz wykonanie odpowiednich rozcieńczeń.
- Inkubacja, płukanie

Odczyt reakcji barwnej wykonywany jest przy długości światła $450\pm 10\text{ nm}$ zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie SPINK1 jest odczytywane następnie z krzywej standardowej.

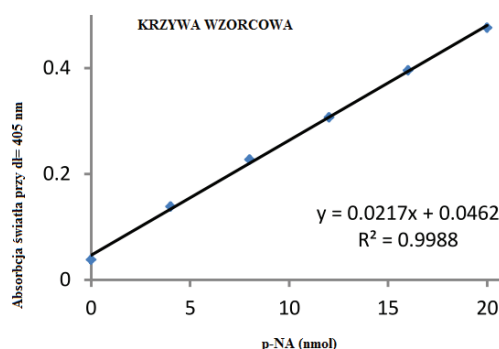


Ryc. 8. Krzywa wzorcowa służąca do odczytu stężenia białka SPINK1

Fig. 8. Standard curve for SPINK1

3.2.2 Oznaczanie aktywności trypsyny:

Aktywność trypsyny była mierzona metodą kolorymetryczną za pomocą Trypsin Activity Assay Kit Abnova. Przez rozszczepienie trypsyny powstaje substrat p-nitroanilina (p-NA), który jest wykrywany przy długości światła 405 nm. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości p-NA. Aktywność trypsyny wyznacza się na podstawie krzywej wzorcowej, wyznaczonej z pomiarów absorpcji roztworów wzorcowych. Aktywność zgodnie z normą powinna być z przedziału 15-143 mU/L [42].



Ryc. 9. Krzywa wzorcowa służąca do odczytu stężenia p-Nitroalaniny i wyrażenia aktywności trypsyny

Fig. 9. Standard curve for p-Nitroalanine and trypsin activity

Oznaczenie aktywności polega na:

- utworzeniu barwnych kompleksów p-NA
- pomiarze absorpcji światła przy długości fali 405 nm
- porównaniu badanej absorbancji do krzywej wzorcowej i odczycie odpowiadającego jej stężenia.

3.2.3 Oznaczanie aktywności amylazy i lipazy

Amylazę i lipazę oznaczono za metodą enzymatycznej spektrofotometrii na analizatorze Architect C8000. Wartości referencyjne amylazy w grupie wiekowej 18-70 lat wynosi 25-125 U/L, a lipazy 8-78 U/L.

3.2.4 Badanie mutacji N34S genu *SPINK 1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy oraz analizy restrykcyjnej

U wszystkich pacjentów badano obecność mutacji N34S przy użyciu metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz analizy restrykcyjnej. Pobraną do próbowki z EDTA próbkę krwi poddano natychmiastowemu mrożeniu w warunkach -80°C . W takich warunkach krew przechowywano do czasu analizy. Do izolacji DNA wykorzystano komercyjnie dostępne złoże tzw. kolumnienki (zestaw QIAamp DNA Blood Mini Kit firmy Qiagene). Metoda izolacji DNA obejmuje etap trawienia z wykorzystaniem proteazy K, etap absorpcji DNA do matrycy silikonowej, etap oczyszczania DNA na matrycy oraz etap elucji DNA. Po oczyszczeniu, DNA wymywane jest ze złoża odpowiednim buforem. Izolację wykonywano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta do zestawu. Reakcję PCR wykonywano z zastosowaniem starterów specyficznych dla fragmentu genu *SPINK 1*. Wykorzystano następujące startery:

1. 5' TTC TGT TTA ATT CCA TTTT AGG CCA AAT GCT GCA 3'
2. 5' GGC TTTT ATC ATA CAA GTG ACT TCT 3'

Łańcuchowa reakcja polimerazy obejmowała wstępną denaturację w temp. 94°C przez 5 min, następnie 35 cykli: denaturacja temp. 94°C (30 s) → hybrydyzacja 60°C (30 s) → wydłużanie 72°C (60 s) oraz końcowe wydłużanie w temp. 72°C (5 min).

Tabela 7. Profil temperaturowy reakcji PCR
Table 7. Temperature profile for PCR reaction

Cykl	Czas (s)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Ilość powtórzeń
Wstępna denaturacja	300	94	1
denaturacja przyłączanie primerów wydłużanie	30 30 60	94 60 72	} 35
Końcowe wydłużanie	300	72	1

Otrzymany produkt PCR został poddany trawieniu 2 enzymami restrykcyjnymi: PstI oraz BsrDI. Rozdział produktów trawienia przeprowadzono w 3% żelu agarozowym. Po trawieniu enzymem PstI długość niezmutowanego (*wild type WT*) produktu genu *SPINK 1* wynosi 320 par zasad (pz) a zmutowanego 286 pz - homozygota.

Tabela 8. Warunki trawienia z użyciem poszczególnych enzymów

Table 8. Conditions of digestion of restriction endonuclease

Enzym	Temperatura trawienia (°C)	Czas trawienia (min)
PstI	37	30
BsrDI	55	15
	80	5

Po trawieniu enzymem BsrDI produkt o długości 286 pz odpowiadał sekwencji niezmutowanej, a o długości 320 pz zmutowanej homozygotie. Heterozygota odpowiadała fragmentom o długości 320 i 286 pz po trawieniu obydwoma enzymami restrykcyjnymi. Długości otrzymywanych fragmentów DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi przedstawia tabela 9.

Tabela 9. Długości fragmentów DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi

Table 9. Lengths of the DNA after digestion with restriction endonuclease

Enzym restrykcyjny	PstI	BsrDI
Homozygota niezmutowana (WT)	320 pz	286 pz
Homozygota zmutowana	286 pz	320 pz
Heterozygota	320 + 286 pz	320 + 286 pz

W przypadku wykrycia mutacji, celem jej potwierdzenia wykonano sekwencjonowanie produktu PCR.

3.3 Ocena skuteczności leczenia

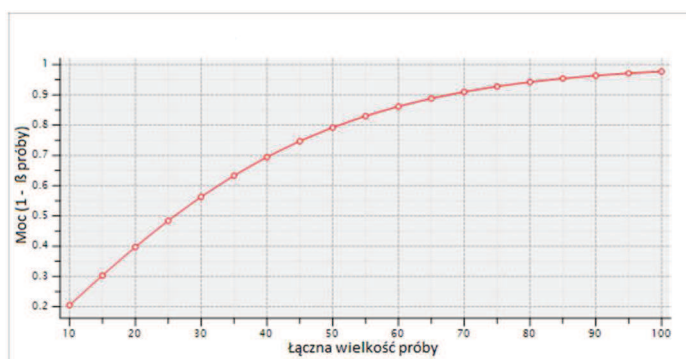
Dla oceny skuteczności zaprojektowano ankietę (Aneks). Jednym z parametrów klinicznych służących do oceny skuteczności leczenia jest masa ciała chorego (wyrażona w BMI). Na podstawie ankiety pacjenci przed zastosowaniem procedury leczniczej jak również podczas wizyty kontrolnej byli ważeni a następnie określano wartości BMI (ocena przyrostu masy ciała od ostatniej wizyty). Kolejnym ocenianym parametrem było występowanie luźnych stolców oraz ich dzienna liczba, przy tym pytaniu było również określane zapotrzebowanie na suplementy enzymów trzustkowych. Nasilenie bólu oceniono przy pomocy 10 stopniowej skali VAS. Ponadto oceniono codzienną sprawność, oraz pytano pacjenta o subiektywną ocenę skuteczności leczenia.

3.4 Analiza statystyczna

Dla zmiennych o charakterze ciągłym wyznaczano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe (OS), natomiast zmienne kategoryczne wyrażono w procentach (%). Celem określenia mocy testu przeprowadzono analizę *post hoc* z wykorzystaniem hipotetycznej średniej wielkości efektu (d Cohena = 0,4), i całkowitej wielkości próby $n=58$. Pomiarzy przeprowadzono przed leczeniem (W1) i po 6 miesiącach (W2). W analizach porównawczych dla średnich stosowano test-T dla par wiązanych. Wykorzystano model regresji liniowej do przewidywania poziomu SPINK 1. W tabelach od 10 do 15 przedstawiono wartości średnie oraz różnice w parach wartości średnich. W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p<0,05$. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu oprogramowania SPSS wersja 23.

4 WYNIKI

4.1 Określenie mocy testu



Ryc. 10. Określenie mocy testu dla oceny zmian stężenia białka SPINK 1

Fig. 10. The post hoc power test for changing in SPINK 1 concentration

Moc testu w przeprowadzonym badaniu osiągnęła akceptowalny poziom 0,85.

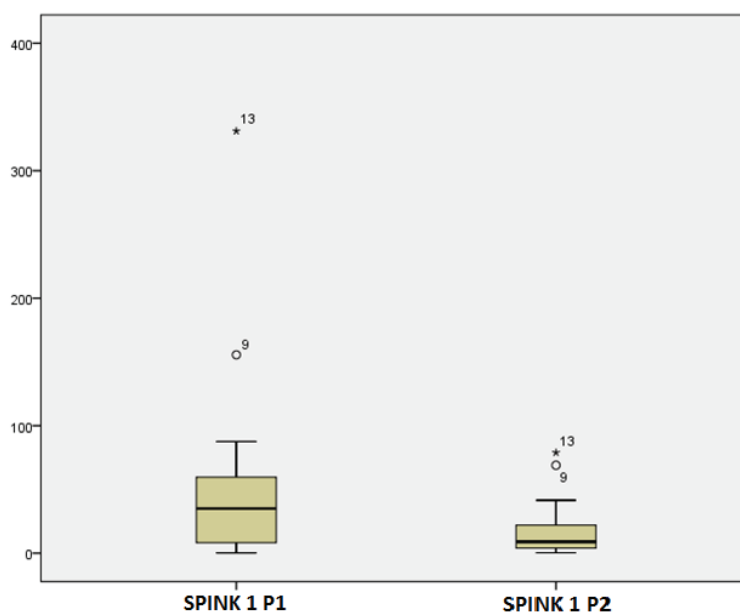
4.2 Stężenie białka SPINK 1

W grupie chorych leczonych metodą chirurgiczną (A) średnie stężenie białka SPINK-1 przed leczeniem wyniosło 46,88 ($\pm 63,6$) ng/mL a w przypadku pacjentów leczonych metodami endoskopowymi (B) 16,55 ($\pm 21,9$) ng/mL. Po leczeniu w 6-miesięcznej obserwacji odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia SPINK-1 w grupie A leczonej chirurgicznie do wartości 16,10 ($\pm 19,2$) ng/mL $p=0,001641$. Nie odnotowano istotnej statystycznie zmiany w stężeniu białka w przypadku pacjentów z grupy B leczonej endoskopowo, u których po 6 miesiącach wartość SPINK 1 wynosiła 16,85 ($\pm 16,9$) ng/mL $p=0,862$.

Tabela 10. Zmiana stężenia białka SPINK 1 po 6 miesiącach w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie (grupa A). P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 10. Changes in SPINK 1 concentration after 6 months in patients from surgery group (group A) P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

GRUPA A (LECZENIE CHIRURGICZNE)			średnie wartości	Różnice w parach				
				średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
PARA	I	SPINK 1 P1 SPINK 1 P2	P1= 46,88 P2= 16,55	30,783	48,563	12,649	48,917	0,002



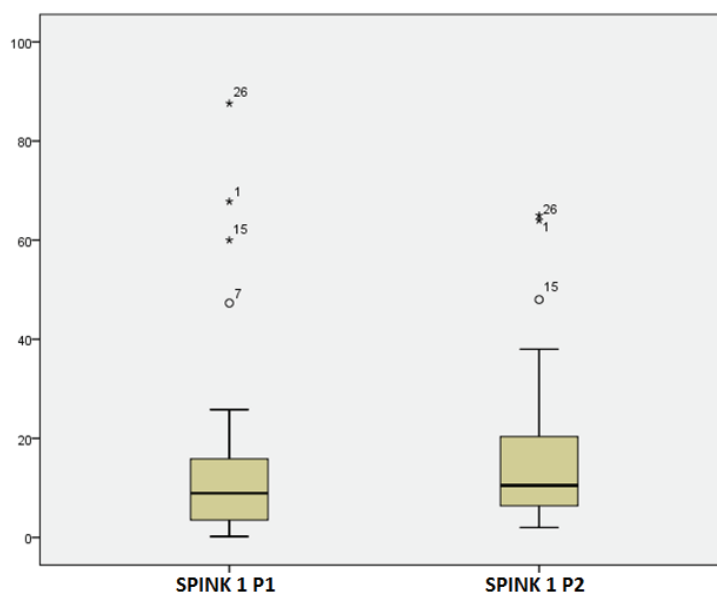
Ryc. 11. Zmiana stężenia białka SPINK 1 po 6 miesiącach w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie (grupa A) z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 11. Changes in SPINK 1 concentration after 6 months in patients from surgery group (group A) with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

Tabela 11. Zmiana stężenia białka SPINK 1 po 6 miesiącach w grupie pacjentów leczonych endoskopowo (grupa B). P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 11. Changes in SPINK 1 concentration after 6 months in patients from endoscopy group (group B), P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

GRUPA B (LECZENIE ENDOSKOPOWE)			średnie wartości	Różnice w parach				
				Średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
PARA	I	SPINK 1 P1 SPINK 1 P2	P1= 16,10 P2= 16,85	-0,298	9,033	-3,800	3,204	0,863



Ryc. 12. Zmiana stężenia białka SPINK 1 po 6 miesiącach w grupie pacjentów leczonych endoskopowo (grupa B) z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 12. Changes in SPINK 1 concentration after 6 months in patients from endoscopy group (group B) with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

4.3 Aktywność trypsyny, amylazy i lipazy

W grupie pacjentów leczonych chirurgicznie (grupa A) średnia aktywność trypsyny przed leczeniem wynosiła 47,93 ($\pm 29,7$) mU/mL. Nie odnotowano istotnie statystycznego spadku aktywności trypsyny po 6 miesiącach, wartość ta wynosiła 45,94 ($\pm 29,1$) mU/mL $p=0,761$. Z kolei w grupie B aktywność trypsyny przed leczeniem endoskopowym wynosiła średnio 40,01 ($\pm 24,8$) mU/mL a po 6 miesiącach odnotowano istotny statystycznie spadek do średniej wartości 34,92 ($\pm 10,7$) mU/mL $p=0,01$. Średnie aktywności amylazy w grupie A przed leczeniem wyniosło 57,10 ($\pm 35,9$) U/L zaś po 6 miesiącach 55,78 ($\pm 34,4$) U/L $p=0,829$. W grupie B natomiast wyjściowa aktywność wynosiła 88,32 (± 133) U/L zaś po leczeniu średnia aktywność wyniosła 54,96 ($\pm 68,7$) U/L i był to spadek istotny statystycznie ($p=0,43$). U pacjentów z grupy A aktywność lipazy przed leczeniem 52,10 ($\pm 82,9$) U/L zaś po 6 miesiącach 37,57 ($\pm 52,81$) U/L $p=0,371$. W grupie B aktywność lipazy przed leczeniem wyniosła 142,56 ($\pm 326,2$) U/L a po leczeniu 49,48 ($\pm 91,08$) U/L $p=0,192$. W tabelach 12 i 13 podano zbiorcze zestawienie porównujące aktywności ww. parametrów przed leczeniem oraz po 6 miesięcznej obserwacji kolejno dla pacjentów leczonych chirurgicznie i endoskopowo.

Tabela 12. Ocena zmian aktywności trypsyny, stężenia lipazy i amylazy u pacjentów grupy A. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 12. Changes in trypsin activity, lipase and amylase concentration in group A, P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

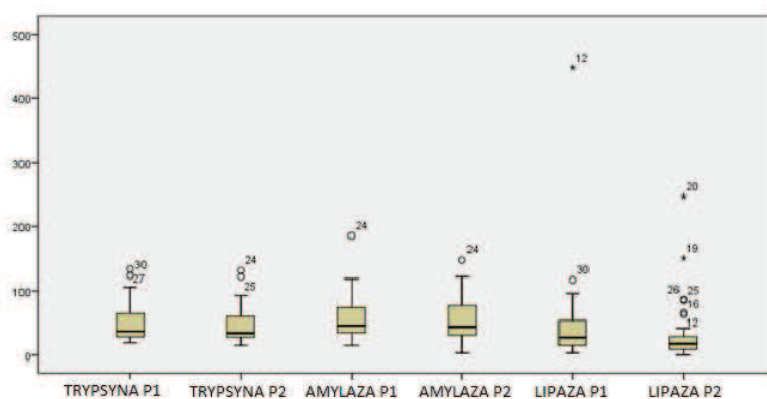
GRUPA A (LECZENIE CHIRURGICZNE)			średnie wartości	Różnice w parach				
				Średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
PARA	I	Trypsyna P1 Trypsyna P2	P1= 47,93 P2= 45,94	1,986	35,529	-11,280	15,253	0,762
	II	Amylaza P1 Amylaza P2	P1= 57,10 P2= 55,78	1,316	33,106	-11,045	13,678	0,829
	III	Lipaza P1 Lipaza P2	P1= 52,10 P2= 37,57	14,533	87,647	-18,194	47,261	0,371

Tabela 13. Ocena zmian aktywności trypsyny, stężenia lipazy i amylazy u pacjentów grupy B, P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 13. Changes in trypsin activity, lipase and amylase concentration in group B, P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

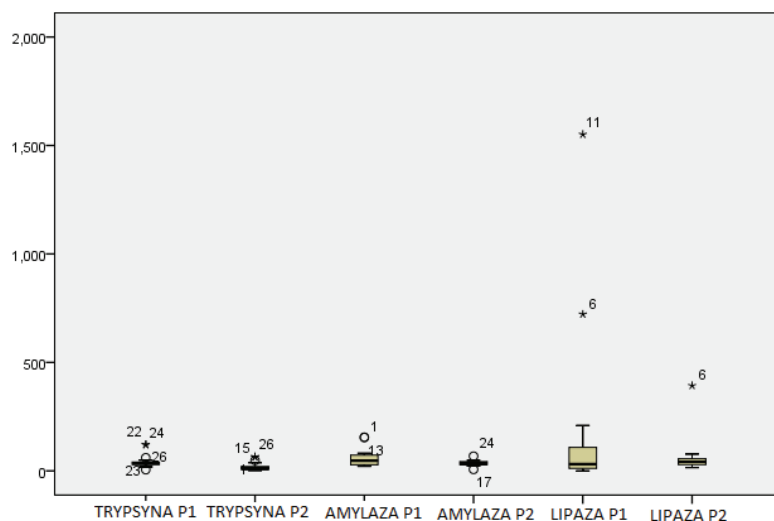
GRUPA B (LECZENIE ENDOSKOPOWE)			Średnie wartości	Różnice w parach				
				Średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
PARA	I	Trypsyna P1 Trypsyna P2	P1=40,01 P2=34,92	23,153	32,659	10,489	35,818	0,01
	II	Amylaza P1 Amylaza P2	P1=57,10 P2=55,78	53,400	133,141	1,773	105,026	0,043
	III	Lipaza P1 Lipaza P2	P1=142,56 P2=49,48	72,428	286,222	-38,556	183,414	0,192

Wyniki przedstawiono graficznie w formie wykresu na rycinach 13 i 14.



Ryc. 13. Ocena zmian aktywności trypsyny, stężenia lipazy i amylazy u pacjentów grupy A, z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 13. Changes in trypsin activity, lipase and amylase concentration in group A with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment



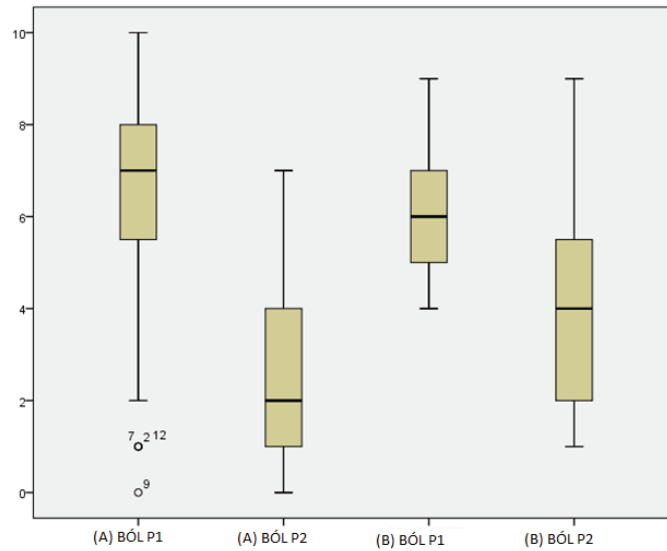
Ryc. 14. Ocena zmian aktywności trypsyny, stężenia lipazy i amylazy u pacjentów grupy B z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 14. Changes in trypsin activity, lipase and amylase concentration in group B with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

4.4 Ocena nasilenia bólu oraz parametrów odżywienia

W 10 stopniowej skali VAS w grupie A średni wynik przed leczeniem wyniósł 6,33 ($\pm 2,89$) natomiast po 6 miesiącach od interwencji nasilenie bólu zmniejszyło się istotnie statystycznie i wyniosło średnio 2,7 ($\pm 2,43$) $p=0,00002$. W przypadku grupy B średnie nasilenie bólu przed leczeniem wynosiło 5,8 ($\pm 1,42$) a po leczeniu 3,82 ($\pm 2,27$) $p=0,000065$.

Natężenie bólu pomiędzy grupą A i B przed leczeniem różni się istotnie statystycznie ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między grupami po 6 miesiącach ($p = 0,076$). Natomiast w obydwu grupach zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie dolegliwości bólowych po leczeniu ($p < 0,001$) (ryc. 15), (tab. 14).



Ryc. 15. Ocena zmian stopnia natężenia bólu (skala VAS) przed leczeniem oraz po 6 miesiącach dla grupy A i B z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 15. Changes in pain intensity (VAS scale) before and 6 month after treatment for group A and B with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

Tabela 14. Ocena zmian stopnia natężenia bólu (skala VAS) przed leczeniem oraz po 6 miesiącach dla grupy A i B, P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 14. Changes in pain intensity (VAS scale) before and 6 month after treatment for group A and B, P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

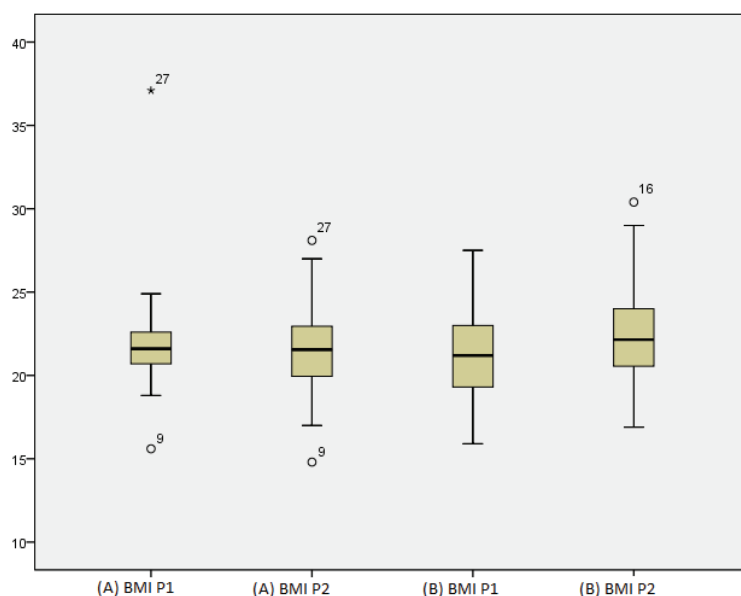
			Średnie wartości	Różnice w parach				
				Średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
GRUPA	A	Ból P1 Ból P2	P1= 6,3 P2= 2,7	3,666	3,407	2,394	4,938	0,000
	B	Ból P1 Ból P2	P1= 5,8 P2= 3,8	2,071	2,324	1,170	2,972	0,000

W grupie A średnia wartość BMI przed operacją wyniosła 21,11 ($\pm 2,77$) natomiast 6 miesięcy po interwencji odnotowano istotny statystycznie wzrost ($p=0,000017$) do wartości 22,39 ($\pm 3,37$). W grupie B przed interwencją endoskopową, średnia wartość BMI wyniosła 21,97 ($\pm 3,4$), a po 6 miesiącach 21,67 ($\pm 2,9$) $p=0,505$.

Tabela 15. Ocena zmian w BMI po 6 miesiącach od leczenia dla grupy A i B, P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Table 15. Changes in BMI 6 month after treatment for group A and B, P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

			średnie wartości	Różnice w parach				
				Średnia	OS	Ufność - 95%	Ufność + 95%	P
GRUPA	A	BMI P1	P1=21,11	-1,264	1,335	-1,754	-7,774	0,000
	BMI P2	P2=22,39						
B	BMI P1	P1=21,97	0,307	2,406	-0,626	1,240	0,505	
	BMI P2	P2=21,67						

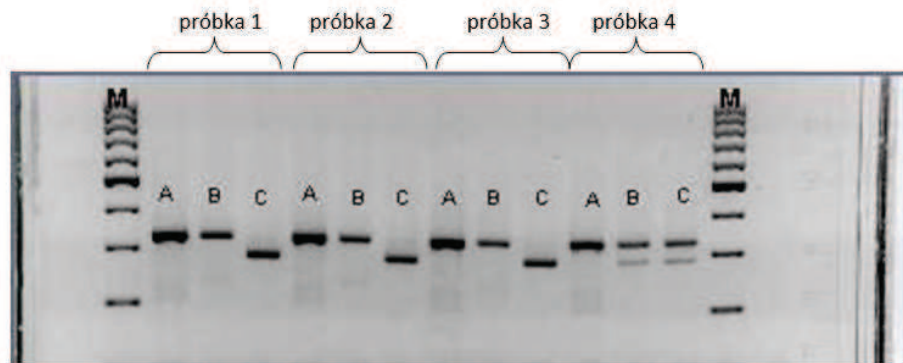


Ryc. 16. Ocena zmian w BMI po 6 miesiącach od leczenia dla grupy A i B z zaznaczeniem rozstępu ćwiartkowego oraz mediany. P1 – wartość przed leczeniem, P2 – wartość po 6 miesiącach od leczenia

Fig. 16. Changes in BMI 6 month after treatment for group A and B with interquartile range and median. P1 – before treatment, P2 – 6 months after treatment

4.5 Badanie mutacji N34S genu *SPINK 1* w badanej populacji chorych

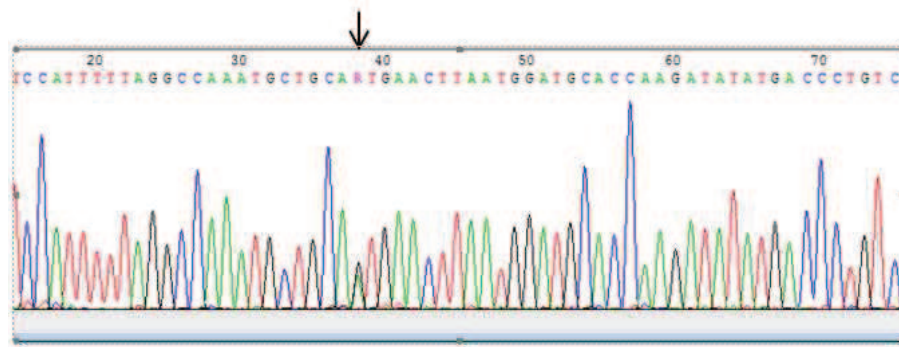
Częstość występowania mutacji N34S w genie *SPINK 1* była jednakowa w obydwu grupach. Obecność mutacji stwierdzono u 2 pacjentów (co stanowiło 3 % badanej populacji). Obydwa przypadki były heterozygotami.



Ryc. 17. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA, otrzymanych po amplifikacji i trawieniu enzymami restrykcyjnymi, pochodzących od czterech wybranych pacjentów (próbki od 1 - 4). M – marker wielkości fragmentów DNA; A – produkt PCR nietrawiony enzymami; B – produkt PCR trawiony enzymem *PstI*; C – produkt PCR trawiony enzymem *BsrDI*. Próbkę 1, 2, 3 przedstawiają homozygotę niezmutowaną. Próbkę 4 to heterozygota z mutacją N34S

*Fig. 17. Electrophoretic separation of the DNA fragments obtained after amplification and digestion with restriction enzymes, from four selected patients (samples 1 - 4). M – marker of DNA fragments; A – undigested PCR product; B – PCR product digested by *PstI* enzyme; C – PCR product digested by *BsrDI* enzyme. Samples 1, 2, 3 show unmutated homozygous. Sample 4 is a heterozygous with N34S mutation*

W przypadku 2 wykrytych mutacji celem ostatecznego potwierdzenia wykonano sekwencjonowanie produktu PCR. W obydwu przypadkach sekwencjonowanie wykazało obecność tranzycji adeniny (A) do guaniny (G). Przykładowy chromatogram potwierdzający występowanie badanej mutacji przedstawia rycina 18.



Ryc. 18. Chromatogram przedstawiający heterozygotyczną tranzycję A→G. Strzałką wskazano miejsce mutacji, w zapisie nukleotydowym oznaczone jako „R”

Fig. 18. Chromatogram showing heterozygous transitions A → G. Arrow indicate mutation, in the nucleotide record marked as "R"

Chorzy, u których wykryto mutację, mimo że mieli stężenia białka SPINK 1 nie odbiegające od badanej populacji, dla czystości obserwacji zostali wyłączeni z dalszej analizy.

5 DYSKUSJA

Przewlekłe zapalenie trzustki jest postępującym procesem zapalnym, podczas którego dochodzi do utraty jej funkcji zewnętrznej i wewnętrzwydzielniczej. Długotrwały przebieg, niska śmiertelność prowadząca do kumulacji chorych powoduje, że PZT staje się chorobą o wymiarze społecznym. W Polsce odnotowujemy ponad 2000 nowych zachorowań rocznie [2]. Ze uwagi na trudności w leczeniu bólu i liczne powikłania, które pojawiają się wraz z rozwojem choroby, pacjenci z PZT są często hospitalizowani. Powoduje to małą zdolność do pracy i zmusza ich do pobierania rent. Dlatego PZT stanowi również istotny problem ekonomiczny [74].

Przyczyny występowania choroby różnią się w zależności od regionu geograficznego. Bezsprzecznie w krajach rozwiniętych najczęstszą przyczyną PZT jest spożywanie alkoholu [56]. Z kolei w krajach mniej rozwiniętych i tropikalnych zaobserwowano, że przewlekłe zapalenie trzustki może być związane z niedożywieniem (zwłaszcza tłuszczowo-białkowym) w dzieciństwie. Ta szczególna postać PZT została nazwana tropikalnym zapaleniem trzustki [49]. Z najbardziej aktualnych badań polskich wynika, że choroba dotyczy w przewadze mężczyzn w wieku 40-50 lat; dane te odpowiadają strukturze demograficznej pacjentów włączonych do mojego badania. Z roku na rok odnotowuje się coraz więcej przypadków występowania PZT, gdzie czynnikiem sprawczym jest nie tylko alkohol. Obserwacja tego trendu zmusiła do ponownej analizy czynników etiologicznych PZT i stworzenia skali M-ANNHEIM, która podkreśla wieloczynnikowe podłoże choroby [26, 65]. Oprócz alkoholu ważną rolę sprawczą odgrywa: palenie tytoniu, nieodpowiednia dieta czy hiperlipidemia.

W ostatnich latach udowodniono, że mutacje genetyczne są również ważnym elementem etiopatogenezy PZT. Obecnie dobrze udokumentowane są mutacje w genach *PRSS 1*, *CFTR* oraz *SPINK 1* [59, 63, 67]. Dowiedziono ważną rolę mutacji w genie kodującym trzustkowy inhibitor tripsyny w etiologii PZT [78]. Dotychczas zidentyfikowano wiele wariantów tej mutacji, jednak najczęściej występującą jest transycja 101A>G w obrębie egzonu 3, genu *SPINK1* powodująca podstawienie asparaginy przez serynę w kodonie 34 (N34S). Nie ma precyzyjnych danych dotyczących częstości występowania mutacji N34S w populacji ogólnej i pacjentów z PZT. Z danych literaturowych wynika, że w populacji ludzi zdrowych występuje ona u ok 1% osób [39, 60]. Z kolei u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki częstość tę szacuje się na 9,7% [36]. W populacji polskiej mutację

tą wykryto aż u 18% chorych z PZT o etiologii alkoholowej [21]. Dane te są opracowane na podstawie stosunkowo małej grupy chorych, co nie pozwala w sposób obiektywny wypowiadać się co do danych populacyjnych. W prezentowanej pracy u wszystkich badanych określono mutację N34S metodą PCR, a w przypadku jej wykrycia, celem ostatecznego potwierdzenia wykonywano sekwencjonowanie genu. Mutację wykryto u 1 pacjenta, w każdej z obydwu grup chorych. Pomimo braku dowodów aby mutacja N34S wpływała na surowicze stężenie białka SPINK 1 [38] pacjentów z wykrytą mutacją wykluczono z dalszej analizy.

Z uwagi na fakt, że początki choroby mogą być nieme klinicznie z reguły do postawienia rozpoznania dochodzi w późnym okresie, średnio po 3,2 roku [24]. Czas jaki mija od wystąpienia pierwszych objawów do podjęcia leczenia średnio wynosi 3,6 roku [68]. W badanej w niniejszej pracy populacji, średni czas od rozpoznania był podobny, dla grup A i B wyniósł odpowiednio 5,23 i 4,68 roku ($p=0,694$). Na tym etapie z reguły występują już powikłania choroby takie jak: cukrzyca, biegunki, spadek masy ciała czy zespół bólowy. Fakt ten wskazuje na potrzebę wprowadzenia narzędzi służących do wczesnej diagnostyki oraz monitorowania postępu choroby. Z nowo dostępnych narzędzi obrazowania na wyróżnienie zasługują S-MRCP czy elastografia EUS [17, 29, 80]. Powszechnie znane testy biochemiczne takie jak: oznaczanie aktywności lipazy, amylazy w surowicy czy elastazy 1 w kale mają jedynie ograniczone zastosowanie [48]. Aktywności amylazy i lipazy mogą być nieznacznie podwyższone. Wysokie wartości obserwuje się tylko podczas zaostrzenia zapalenia trzustki. Na późniejszych etapach PZT atrofia mięszu trzustki prowadzi do normalizacji aktywności enzymów w surowicy. Świadczy to o znacznym zaawansowaniu choroby. Nieprawidłowe trawienie i złe wchłanianie występują dopiero, gdy dojdzie do unieczynnienia ok. 90% mięszu trzustki [10]. Biegunki są więc przejawem zaawansowania procesu zapalnego. Z tego względu ani jakościowa, ani ilościowa analiza tłuszczów w kale nie jest dobrym sposobem na wczesne wykrycie schorzenia. Badanie chymotrypsyny oraz elastazy 1 w kale mają te same ograniczenia, ale są przydatne w potwierdzeniu niewydolności zewnątrzwydzielniczej [50]. W badanej populacji biegunki występowały u 14 (46%) pacjentów w grupie leczonej chirurgicznie (grupa A) oraz u 15 (53%) w grupie leczonej endoskopowo (grupa B). Średnia wartość BMI nie różniła się istotnie między grupami i wynosiła kolejno dla grupy A i B 21,11 i 21,97 ($p=0,298$). Średnia aktywność amylazy w grupie A przed leczeniem wyniosła 57,10 ($\pm 35,9$) U/L zaś po 6 miesiącach od interwencji 55,78 U/L ($\pm 34,4$) $p=0,829$. W grupie B natomiast wyjściowa aktywność wyniosła 88,32 (± 133) U/L zaś 6 miesięcy po leczeniu średnia aktywność wyniosła 54,96 ($\pm 68,7$) U/L i był

to spadek istotny statystycznie ($p=0,43$). U pacjentów z grupy A aktywność lipazy przed leczeniem wynosiła $52,10 (\pm 82,9)$ U/L zaś po 6 miesiącach $37,57 (\pm 52,81)$ U/L $p=0,371$. W grupie B aktywność lipazy przed leczeniem wyniosła $142,56 (\pm 326,2)$ U/L a po leczeniu $49,48 (\pm 91,08)$ U/L $p=0,192$. Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że w badanej populacji pacjenci byli w stadium średniego zaawansowania choroby oraz w okresie objętym badaniem nie przechodzili zaostrzeń. Badania te potwierdzają również fakt, iż badanie aktywności enzymów trzustkowych nie ma istotnego znaczenia prognostycznego w PZT.

Mierzenie aktywności trypsyny nie jest powszechnie wprowadzone do diagnostyki laboratoryjnej PZT. Trypsyna jest enzymem trawiennym wytwarzanym w komórkach zrazikowych trzustki. Wydzielana jest w formie trypsynogenu, którego aktywacja do trypsyny jest regulowana przez poziom wapnia. Uważa się, że przedwczesna aktywacja trypsyny w zrazikach trzustki prowadzi do aktywacji pozostałych proenzymów trzustkowych i w konsekwencji do zapalenia. Na podstawie tych informacji można wnioskować, że trypsyna odgrywa kluczową rolę w kontroli aktywności wszystkich enzymów trzustkowych oraz w patogenezie zapalenia trzustki [42, 76]. Udowodniono, że mierzenie aktywności trypsyny jest czułym markerem w przypadku ostrego zapalenia trzustki [42]. Nie znaleziono w piśmiennictwie opracowań na temat przydatności pomiaru aktywności trypsyny w diagnostyce PZT. W mojej pracy określono aktywność trypsyny przed leczeniem oraz po 6 miesiącach od interwencji. W grupie pacjentów leczonych chirurgicznie średnia aktywność trypsyny przed leczeniem wynosiła $47,93 (\pm 29,7)$ mU/mL. Nie odnotowano istotnie statystycznego spadku aktywności trypsyny po 6 miesiącach; wartość ta wynosiła $45,94 (\pm 29,1)$ mU/mL $p=0,761$. Z kolei w grupie B aktywność trypsyny przed leczeniem endoskopowym wynosiła średnio $40,01 (\pm 24,8)$ mU/mL a po 6 miesiącach odnotowano istotny statystycznie spadek do średniej wartości $34,92 (\pm 10,7)$ mU/mL $p=0,01$. W obydwu grupach średnia aktywność trypsyny nie przekraczała wartości referencyjnych. Dane te sugerują, że tak samo jak w przypadku lipazy i amylazy, określanie aktywności trypsyny u pacjentów leczonych z powodu PZT nie przynosi wymiernych korzyści diagnostycznych. Przydane klinicznie byłoby wprowadzenie do praktyki klinicznej parametru laboratoryjnego, który mógłby służyć do diagnozowania, określania stopnia zaawansowania choroby, a tym samym pomagać w wyborze odpowiedniego leczenia oraz ocenie jego skuteczności.

Białko SPINK 1 odgrywa istotną rolę w patogenezie PZT. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że na podstawie stężenia białka SPINK 1 można odpowiednio zakwalifikować pacjentów do właściwej metody leczniczej. Ponadto monitorowanie stężenia SPINK 1 w dobry sposób koresponduje ze skutecznością podjętej interwencji mierzonej skalą bólu oraz parametrami odżywienia. W przeprowadzonym badaniu 30 pacjentów chorujących na PZT poddano leczeniu chirurgicznemu a 28 endoskopowemu. Pod względem struktury wieku, czynników etiologicznych, i stosunku płci badane grupy okazały się bardzo podobne. W pracy poddano analizie stężenia białka SPINK 1 przed zastosowanym leczeniem oraz w 6-miesięcznej obserwacji. Taki okres kontroli wynikał z faktu, że surowiczy poziom białka SPINK 1 może być podwyższony po zabiegach operacyjnych, poważnych urazach oraz w trakcie infekcji [33, 51], dlatego też pacjenci podczas wizyty kontrolnej byli również badani pod kątem infekcji oraz wykluczono u nich przebyte ostatnio poważne urazy. Dotychczas nie przeprowadzano analizy zmian stężenia białka SPINK 1 u chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki. Jak dotąd badania nad SPINK 1 dotyczyły przede wszystkim roli mutacji *SPINK 1* w patogenezie PZT, a stężenie określano jedynie w kontekście wpływu mutacji N34S na surowicze stężenie białka. Badania te wykazały, że w przypadku występowania tej mutacji stężenie białka SPINK 1 może być obniżone [38]. Ponadto ekspresja białka SPINK 1 była również określana w badaniach immunohistochemicznych preparatów trzustki, gdzie wykazano zwiększone występowanie białka SPINK 1 nie tylko w przypadku raka trzustki, ale także w przypadku śródprzewodowego brodawkowatego nowotworu śluzowego oraz zmian śródnałnkowych trzustki (IPMN i PanINs) [57]. Dodatkowo obiecujące wydaje się być określanie stężenia białka SPINK w rozróżnianiu łagodnych guzów torbielowatych trzustki od nowotworów złośliwych [62]. W zastosowanej przeze mnie metodzie ELISA wartości referencyjne stężenia białka SPINK 1 powinny mieścić się w granicach 2,86-22,62 ng/mL. W grupie pacjentów leczonych chirurgicznie (grupa A) średnie stężenie białka SPINK 1 przed leczeniem wyniosło 46,88 ($\pm 63,6$) ng/mL, po 6 miesiącach odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia SPINK 1 do 16,10 ($\pm 19,2$) ng/mL $p=0,001$. Z kolei w grupie pacjentów leczonych metodami endoskopowymi (grupa B) średnie stężenie przed interwencją wynosiło 16,55 ($\pm 21,9$) ng/mL, a po 6 miesiącach średnie stężenie wynosiło 16,85 ($\pm 16,9$) ng/mL. Nie odnotowano istotnej statystycznie zmiany w stężeniu w tej grupie chorych. Powyższe wyniki wskazują, że wzrost stężenia białka SPINK 1 dobrze koresponduje ze stadium zaawansowania choroby oraz z długością jej trwania. Pacjenci z grupy A mieli dłuższy średni czas od rozpoznania PZT do wdrożenia leczenia

chirurgicznego, w tej grupie również większość pacjentów przechodziła wcześniej endoterapię, która okazywała się nieskuteczna w ich przypadku. W grupie B czas od rozpoznania do leczenia był krótszy, ponadto warunkiem włączenia do tej grupy była pierwszorazowa interwencja endoskopowa. Można wnioskować zatem, że pacjenci z grupy A byli na wyższym stadium zaawansowania choroby. Z drugiej strony w przeprowadzonym badaniu wykazano, że chirurgiczna dekompresja przewodu Wirsunga skutecznie obniża stężenie białka SPINK 1, co koreponduje również z poprawą dolegliwości bólowych oraz wzrostem BMI. W 10-stopniowej skali bólu (VAS) w grupie A średni wynik przed leczeniem wyniósł 6,33 ($\pm 2,89$) natomiast po 6 miesiącach od interwencji nasilenie bólu zmniejszyło się istotnie statystycznie i wyniosło średnio 2,7 ($\pm 2,43$) $p=0,00002$. W przypadku grupy B średnie nasilenie bólu przed leczeniem wynosiło 5,8 ($\pm 1,42$) a po leczeniu 3,82 ($\pm 2,27$) $p=0,000065$. Stopień natężenie bólu między grupą A i B przed leczeniem różnił się istotnie statystycznie ($p<0,001$). Natomiast w obydwu grupach zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie dolegliwości bólowych po leczeniu ($p<0,001$). Świadczy to, że obie metody skutecznie wpływają na ustąpienie dolegliwości bólowych. Ponadto w grupie A średnia wartość BMI przed operacją wyniosła 21,11 ($\pm 2,77$) natomiast po 6 miesiącach odnotowano istotny statystycznie wzrost ($p=0,000017$) do wartości 22,39 ($\pm 3,37$). W grupie B przed interwencją endoskopową średnia wartość BMI wyniosła 21,97 ($\pm 3,4$), a po 6 miesiącach 21,67 ($\pm 2,9$) $p=0,505$. Wydaje, że badanie stężenia białka SPINK 1 z powodzeniem może być wykorzystane jako dodatkowy parametr ułatwiający kwalifikację do określonej metody leczniczej. Może być również wykorzystane do obiektywnej oceny skuteczności postępowania chirurgicznego.

Kwalifikacja do leczenia była przeprowadzona zgodnie z aktualnymi wytycznymi. Obecnie obowiązująca strategia polega na zwiększaniu stopnia intensywności (inwazyjności) leczenia w zależności od stanu chorego, (tzw. *step-up approach*). W praktyce wygląda to następująco: leczenie rozpoczyna się od eliminacji czynników zaostrzających zapalenie, suplementacji enzymów trzustkowych oraz farmakologicznej kontroli bólu [55]. Po nieskutecznym leczeniu zachowawczym, z reguły wykonuje się ECPW z protezowaniem dróg trzustkowych. ESGE wydało rekomendację, iż leczenie endoskopowe powinno być leczeniem pierwszego wyboru w przypadkach niepowikłanego przewlekłego zapalenia trzustki z zespołem bólowym. W przypadku niezadawalającego efektu dalsze leczenie powinno zostać omówione przez zespół wielospecjalistyczny (gastroenterolog-endoskopista, chirurg i radiolog). W tej sytuacji należy rozważyć leczenie operacyjne zwłaszcza w przypadku chorych, którzy nie rokują na trwałą odpowiedź po endoterapii [15].

Na podstawie analizy stężenia białka SPINK 1 można stwierdzić, że pacjenci w przeprowadzonym badaniu byli właściwie zakwalifikowani do wybranej metody leczniczej oraz, że aktualna strategia oparta na zasadzie *step-up* jest właściwa. Od lat trwa dyskusja na temat optymalnej strategii postępowania w poszczególnych stopniach zaawansowania choroby. Rozważania nad przewagą metody endoskopowej czy chirurgicznej są tematem wielu publikacji. Pod uwagę brane są czynniki takie jak: poprawa jakości życia, zniesienie dolegliwości bólowych, wzrost masy ciała, liczba powikłań, ale również aspekt ekonomiczny. W świetle nowych doniesień, aktualne wytyczne mogą ulec zmianie w najbliższych latach.

Analizując prace opublikowane w ostatnim 20-leciu, pierwszą porównującą leczenie endoskopowe z chirurgicznym była publikacja Ditego i wsp. przeprowadzona na grupie 72 pacjentów z PZT randomizowanych do grupy leczonej chirurgicznie i endoskopowo [12]. W trakcie trzy- i pięcioletniej obserwacji, autorzy wykazali większy odsetek ustąpienia dolegliwości bólowych oraz przyrost masy ciała w grupie leczonych chirurgicznie. Przełomowa okazała się praca opublikowana na łamach NEJM przez Diune Cahen i wsp. Przeprowadzili oni badanie, do którego włączyli pacjentów z łagodnym zwężeniem przewodu trzustkowego w przebiegu PZT i randomizowali ich do 2 grup [5]. Pierwsza leczona była endoskopowo, a druga chirurgicznie. Wyłoniono dwie homogenne grupy chorych na podstawie kryteriów włączenia, które obejmowały m.in.: poszerzenie przewodu Wirsunga oraz zespół bólowy; wykluczono natomiast pacjentów po przebytych zabiegach w obrębie trzustki, z guzem zapalnym i podejrzeniem nowotworu. W badaniu oceniono jakość życia po zastosowanym leczeniu. Autorzy byli krytykowani z powodu małej liczebności grup oraz z powodu krótkiego okresu obserwacji. Mała liczebność grup wynikała z chęci uzyskania możliwie najbardziej homogennych grup. Badacze określili *a priori* moc testu na poziomie 90% przy liczebności grup po 23 pacjentów, do badania włączono po 25 osób [4]. W ten sposób odparto pierwszy zarzut. Obliczenia liczebności próby stanowią ważny etap planowania eksperymentu, gdyż bez nich, uzyskane wyniki nie mają mocy dowodowej. W moim opracowaniu również posłużono się analizą mocy testu *post-hoc*, w której określono moc na 85% przy liczebności $n=55$. Wracając do badania Cahena i wsp., krótki okres obserwacji wynikał z decyzji o zaprzestaniu endoterapii podjętej przez nadzorującą komisję bioetyczną, ze względu na uzyskanie znacząco lepszych wyników w grupie chorych leczonych chirurgicznie. W roku 2015 roku autorzy z *Hammersmith Hospital* w Londynie dokonali metaanalizy, w której zebrano wszystkie publikacje dotyczące wyników leczenia endoskopowego lub chirurgicznego poczynając od stycznia 1994 do października 2014 korzystając z baz:

MEDLINE, EMBASE, Ovid i Cochrane. Ostatecznie przeanalizowano 21 pozycji literaturowych. Z metaanalizy tej wynika, że leczenie chirurgiczne jest bardziej skuteczne niż endoskopowe. Jednocześnie zaznaczono, że za pomocą endoterapii można osiągnąć poprawę dolegliwości bólowych, jednakże korzyści są zwykle krótkotrwałe i istnieje konieczność częstego powtarzania procedury [32]. Należy jednak być ostrożnym w formułowaniu tak daleko idących wniosków, ponieważ dotychczas nie powstało wielośrodkowe kontrolowane badanie kliniczne z randomizacją (RCT). Obiecujące mogą być wyniki prowadzonego aktualnie przez duńskich naukowców randomizowanego badania ESCAPE. Autorzy chcą porównać wyniki wcześniej zastosowanego leczenia chirurgicznego z obecnie przyjętymi standardami terapii (*step-up approach*) [1]. Aktualnie nie bez znaczenia pozostaje aspekt ekonomiczny stosowanej terapii. W przeprowadzonej w 2014 roku metaanalizie dotyczącej kosztów terapii, jednym z końcowych wniosków było stwierdzenie, iż leczenie pacjentów z PZT jest bardzo obciążające dla budżetu oraz że leczenie chirurgiczne może obniżyć koszty pośrednie i bezpośrednie leczenia [24]. Podobną analizę przeprowadzono w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku. Określono, iż koszty leczenia endoskopowego w 3-letniej obserwacji przewyższają koszty leczenia chirurgicznego, przy porównywalnych efektach stosowanych terapii. Pacjenci z łagodnym zwężeniem przewodu trzustkowego nie powinni być leczeni endoskopowo dłużej niż 12 miesięcy [40]. Powyższe opracowania z pewnością wnoszą ogromny wkład do ustalenia optymalnej strategii postępowania w PZT. Idealna terapia powinna przynosić jak największe korzyści dla pacjentów, jednocześnie być możliwie bezpieczna oraz mieć uzasadnienie ekonomiczne. Dotychczasowe doniesienia dowodzą, że leczenie chirurgiczne przynosi trwalsze efekty, należy jednak pamiętać, że jest to postępowanie bardziej inwazyjne i niosące o wiele poważniejsze ryzyko powikłań niż ECPW. Wydaje się, że wyniki mojej pracy mogą wnieść do toczącej się dyskusji dodatkowy cenny parametr diagnostyczny służący do bardziej precyzyjnego kwalifikowania chorych do obydwu metod oraz do oceny skuteczności terapii chirurgicznej.

Należy zaznaczyć, że w świetle najnowszych doniesień, białko SPINK 1 oprócz swych fizjologicznych funkcji w ochronie przed zapaleniem trzustki niesie ryzyko transformacji nowotworowej. Na przestrzeni lat liczne badania wykazały, iż przewlekłe zapalenie trzustki jest ważnym czynnikiem ryzyka wystąpienia w późniejszym okresie raka trzustki [45]. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować dokładnego mechanizmu jaki miałyby łączyć te dwie choroby. Wydaje się jednak,

że w procesie tym ważną rolę odgrywa białko SPINK 1. Przełomowym było odkrycie, że białko SPINK 1 działa jako czynnik wzrostu. Jego budowa strukturalna jest podobna do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), udowodniono również, że może ono stymulować receptor EGF (EGFR) powodując wzrost fibroblastów, komórek endotelialnych i epitelialnych oraz na modelu szczurzym zaobserwowano rozrost komórek raka gruczołowego trzustki [31]. Szczególnie ważna dla komórek raka trzustki jest aktywność szlaku mitogennego zależnego od receptorów z rodziny EGF. Nadekspresję EGFR stwierdza się w komórkach raka trzustki w 40-70% preparatów wykonanych z guzów nowotworowych usuniętych chirurgicznie [34, 71]. Ponadto raki z nadekspresją EGFR cechują się większą agresywnością i opornością na leczenie [54]. Na podstawie tych doniesień, rozpoczęto badania nad opracowaniem humanizowanego monoklonalnego przeciwciała anty SPINK 1 i wprowadzenia go do terapii przeciwnowotworowej [70]. Jednak wykorzystanie takiej potencjalnej terapii jest kontrowersyjne, gdyż białko SPINK 1 jest niezbędne w mechanizmie ochrony trzustki przed zapaleniem i ingerowanie w ten fizjologiczny mechanizm może nieść za sobą wzrost ryzyka zapaleń trzustki. W badaniach na zwierzętach wykazano bowiem, że u myszy, u których wyłączono gen *Spink 3* (analogiczny do ludzkiego *SPINK 1*) dochodziło do ciężkich zapaleń trzustki w mechanizmie niepojętej aktywacji trypsyny [75].

Te niezwykle ważne informacje upoważniają do wysunięcia tezy, że u pacjentów chorujących z powodu przewlekłego zapalenia trzustki, będącego istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka trzustki należy za wszelką cenę dążyć do utrzymania stężenia białka SPINK 1 w graniach normy. W niniejszej pracy udowodniono, że dekompresja przewodu trzustkowego sposobem chirurgicznym skutecznie obniża stężenie białka SPINK 1, zatem prawdopodobnie zmniejsza ryzyko transformacji nowotworowej u tych pacjentów. Nie wykazano tendencji spadkowej w przypadku leczenia endoskopowego. Należy jednak podkreślić, że w tej grupie średnie stężenie białka SPINK1 mieściło się w normie i podobne wartości obserwowano również po 6 miesiącach. Można uznać, że dekompresja PT podczas endoterapii jest również skuteczna, ponieważ nie doszło do wzrostu stężenia SPINK 1. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że białko SPINK 1 może być dobrym parametrem służącym do określania stopnia zaawansowania PZT, kwalifikacji do określonej metody leczniczej oraz monitorowania jej przebiegu.

6 WNIOSKI

1. Analiza stężenia białka SPINK 1 oznaczanego przed leczeniem, wykazała, że w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie jego poziom był istotnie statystycznie wyższy niż w grupie pacjentów leczonych endoskopowo. Świadczy to o właściwej kwalifikacji chorych do wybranej metody leczenia w analizowanym materiale.
2. U pacjentów leczonych chirurgicznie, po operacji obserwowano istotny statystycznie spadek stężenia białka SPINK 1, który korelował z odpowiedzią kliniczną. Monitorowanie stężenia białka SPINK 1 może być przydatnym klinicznie wskaźnikiem skuteczności leczenia chirurgicznego PZT.
3. Wobec niskich wyjściowych stężeń białka SPINK 1 u chorych leczonych endoskopowo, dalsze monitorowanie jego poziomu po zabiegu nie ma znaczenia prognostycznego.

7 PIŚMIENICTWO

- 1 Ahmed Ali U, Issa Y, Bruno MJ, van Goor H, van Santvoort H, Busch ORC, Dejong CHC, Nieuwenhuijs VB, van Eijck CH, van Dullemen HM, Fockens P, Siersema PD, Gouma DJ, van Hooft JE, Keulemans Y, Poley JW, Timmer R, Besselink MG, Vleggaar FP, Wilder-Smith OH, Gooszen HG, Dijkgraaf MGW, Boermeester MA, Dutch Pancreatitis Study Group. Early surgery versus optimal current step-up practice for chronic pancreatitis (ESCAPE): design and rationale of a randomized trial. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 49
- 2 Anita Gąsiorowska, Ewa Małecka-Panas. Diagnostyka i leczenie przewlekłego zapalenia trzustki. *Przew Lek* 2007 1 76-86
- 3 Apte MV, Wilson JS. Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 316–320
- 4 Cahen DL, Gouma DJ, Laramée P, Nio Y, Rauws EAJ, Boermeester MA, Busch OR, Fockens P, Kuipers EJ, Pereira SP, Wonderling D, Dijkgraaf MGW, Bruno MJ. Long-term Outcomes of Endoscopic vs Surgical Drainage of the Pancreatic Duct in Patients With Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 1690–1695
- 5 Cahen DL, Gouma DJ, Nio Y, Rauws EA, Boermeester MA, Busch OR, Stoker J, Laméris JS, Dijkgraaf MG, Huibregtse K, others. Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 2007; 356: 676–684
- 6 Casetti L, Bassi C, Salvia R, Butturini G, Graziani R, Falconi M, Frulloni L, Crippa S, Zamboni G, Pederzoli P. “Paraduodenal” pancreatitis: results of surgery on 58 consecutive patients from a single institution. *World J Surg* 2009; 33: 2664–2669
- 7 Catalano MF, Sahai A, Levy M, Romagnuolo J, Wiersema M, Brugge W, Freeman M, Yamao K, Canto M, Hernandez LV. EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 1251–1261
- 8 Chinnakotla S, Radosevich DM, Dunn TB, Bellin MD, Freeman ML, Schwarzenberg SJ, Balamurugan AN, Wilhelm J, Bland B, Vickers SM, Beilman GJ, Sutherland DER, Pruett TL. Long-term outcomes of total pancreatectomy and islet auto transplantation for hereditary/genetic pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2014; 218: 530–543

- 9 Clarke B, Slivka A, Tomizawa Y, Sanders M, Papachristou GI, Whitcomb DC, Yadav D. Endoscopic therapy is effective for patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2012; 10: 795–802
- 10 Conwell DL, Lee LS, Yadav D, Longnecker DS, Miller FH, Morteale KJ, Levy MJ, Kwon R, Lieb JG, Stevens T, Toskes PP, Gardner TB, Gelrud A, Wu BU, Forsmark CE, Vege SS. American Pancreatic Association practice guidelines in chronic pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines. *Pancreas* 2014; 43: 1143–1162
- 11 DiMagno MJ, DiMagno EP. Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 490–498
- 12 Díte P, Ruzicka M, Zboril V, Novotný I. A prospective, randomized trial comparing endoscopic and surgical therapy for chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2003; 35: 553–558
- 13 Díte P, Starý K, Novotný I, Precechtelová M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 749–750
- 14 Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 286–290
- 15 Dumonceau J-M, Delhaye M, Tringali A, Dominguez-Munoz JE, Poley J-W, Arvanitaki M, Costamagna G, Costea F, Devière J, Eisendrath P, Lakhtakia S, Reddy N, Fockens P, Ponchon T, Bruno M. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* 2012; 44: 784–800
- 16 Eleftherladis N, Dinu F, Delhaye M, Le Moine O, Baize M, Vandermeeren A, Hookey L, Devière J. Long-term outcome after pancreatic stenting in severe chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2005; 37: 223–230
- 17 Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682–707
- 18 Frulloni L, Falconi M, Gabbrielli A, Gaia E, Graziani R, Pezzilli R, Uomo G, Andriulli A, Balzano G, Benini L, Calculli L, Campra D, Capurso G, Cavestro GM, De Angelis C, Ghezzi L, Manfredi R, Malesci A, Mariani A, Mutignani M, Ventrucchi M, Zamboni G, Amodio A, Vantini I, Italian Association for the Study of the Pancreas (AISP), Bassi C, Delle Fave G, Frulloni L, Vantini I, Falconi M, Frulloni L, Gabbrielli A, Graziani R, Pezzilli R, Capurso IV, Cavestro GM, De Angelis C, Falconi M, Gaia E, Ghezzi L, Gabbrielli A, Graziani R, Manfredi R, Malesci A, Mariani A, Mutignani M,

- Pezzilli R, Uomo G, Ventrucci M, Zamboni G, Vantini I, Magarini F, Albarello L, Alfieri S, Amodio A, Andriulli A, Anti M, Arcidiacono P, Baiocchi L, Balzano G, Benini L, Berretti D, Boraschi P, Buscarini E, Calculli L, Carroccio A, Campa D, Celebrano MR, Capurso G, Casadei R, Cavestro GM, Chilovi F, Conigliaro R, Dall'Oglio L, De Angelis C, De Boni M, De Pretis G, Di Priolo S, Di Sebastiano PL, Doglietto GB, Falconi M, Filauro M, Frieri G, Frulloni L, Fuini A, Gaia E, Ghezzi L, Gabbrielli A, Graziani R, Loriga P, Macarri G, Manes G, Manfredi R, Malesci A, Mariani A, Massucco P, Milani S, Mutignani M, Pasquali C, Pederzoli P, Pezzilli R, Pietrangeli M, Rocca R, Russello D, Siquini W, Traina M, Uomo G, Veneroni L, Ventrucci M, Zilli M, Zamboni G. Italian consensus guidelines for chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2010; 42 Suppl 6: S381-406
- 19 Gardner TB, Levy MJ, Takahashi N, Smyrk TC, Chari ST. Misdiagnosis of autoimmune pancreatitis: a caution to clinicians. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1620–1623
 - 20 Gardner TB, Taylor DJ, Gordon SR. Reported Findings on Endoscopic Ultrasound Examinations for Chronic Pancreatitis: Toward Establishing an Endoscopic Ultrasound Quality Benchmark. *Pancreas* 2014; 43: 37–40
 - 21 Gasiorowska A, Talar-Wojnarowska R, Czupryniak L, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, Malecka-Panas E. 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: 894–901
 - 22 Graf R, Schiesser M, Bimmler D. Increased secretion of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI-I, monitor peptide) during development of chronic pancreatitis in the WBN/kob rat. *Pancreatology* 2002; 2: 108–115
 - 23 Gupte AR, Forsmark CE. Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 30: 500–505
 - 24 Hall TC, Garcea G, Webb MA, Al-Leswas D, Metcalfe MS, Dennison AR. The socio-economic impact of chronic pancreatitis: a systematic review. *J Eval Clin Pract* 2014; 20: 203–207
 - 25 Hart PA, Zen Y, Chari ST. Recent Advances in Autoimmune Pancreatitis. *Gastroenterology* 2015; 149: 39–51

- 26 He Y-X, Xu H-W, Sun X-T, Ye Z, Wang W, Lai X-W, Wang X-T, Hu L-H, Sun C, Liao Z, others. Endoscopic management of early-stage chronic pancreatitis based on m-annheim classification system: a prospective study. *Pancreas* 2014; 43: 829–833
- 27 Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhaye M, Spicak J, Drumm B, Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP, European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2004; 2: 252–261
- 28 Huhtala ML, Pesonen K, Kalkkinen N, Stenman UH. Purification and characterization of a tumor-associated trypsin inhibitor from the urine of a patient with ovarian cancer. *J Biol Chem* 1982; 257: 13713–13716
- 29 Iglesias-Garcia J, Domínguez-Muñoz JE, Castiñeira-Alvariño M, Luaces-Regueira M, Lariño-Noia J. Quantitative elastography associated with endoscopic ultrasound for the diagnosis of chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2013; 45: 781–788
- 30 Issa Y, van Santvoort HC, van Goor H, Cahen DL, Bruno MJ, Boermeester MA. Surgical and Endoscopic Treatment of Pain in Chronic Pancreatitis: A Multidisciplinary Update. *Dig Surg* 2013; 30: 35–50
- 31 Itkonen O, Stenman U-H. TATI as a biomarker. *Clin Chim Acta* 2014; 431: 260–269
- 32 Jawad ZAR, Kyriakides C, Pai M, Wadsworth C, Westaby D, Vlavianos P, Jiao LR. Surgery remains the best option for the management of pain in patients with chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Asian J Surg Asian Surg Assoc* 2016;
- 33 Jönsson P, Linder C, Genell S, Ohlsson K. Extrapancreatic origin of the pancreatic secretory trypsin inhibitor as an acute-phase reactant. *Pancreas* 1996; 12: 303–307
- 34 Karandish F, Mallik S. Biomarkers and Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. *Biomark Cancer* 2016; 8: 27–35
- 35 Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc* 1948; 70: 3034–3040

- 36 Kereszturi E, Király O, Sahin-Tóth M. Minigene analysis of intronic variants in common SPINK1 haplotypes associated with chronic pancreatitis. *Gut* 2009; 58: 545–549
- 37 Ketwaroo G, Brown A, Young B, Kheraj R, Sawhney M, Morteale KJ, Najarian R, Tewani S, Dasilva D, Freedman S, Sheth S. Defining the Accuracy of Secretin Pancreatic Function Testing in Patients With Suspected Early Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1360–1366
- 38 Kume K, Masamune A, Ariga H, Hayashi S, Takikawa T, Miura S, Suzuki N, Kikuta K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Shimosegawa T. Do genetic variants in the SPINK1 gene affect the level of serum PSTI? *J Gastroenterol* 2012; 47: 1267–1274
- 39 Kume K, Masamune A, Mizutamari H, Kaneko K, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Kimura K, Suzuki N, Nagasaki Y, Horii A, Shimosegawa T. Mutations in the serine protease inhibitor kazal type 1 (SPINK1) gene in Japanese patients with pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 354–360
- 40 Łaski D, Hać S. Porównanie kosztów bezpośrednich oraz skuteczności leczenia przewlekłego zapalenia trzustki z nienowotworowym zwężeniem przewodu trzustkowego. 2014;
- 41 Layer P, Melle U. Chronic Pancreatitis: Definition and Classification for Clinical Practice. In: MD JED-M, MD P (eds.). *Clinical Pancreatology*. Blackwell Publishing Ltd, 2004: 180–186
- 42 Le Moine O, Devaster JM, Devière J, Thiry P, Cremer M, Ooms HA. Trypsin activity. A new marker of acute alcoholic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2634–2638
- 43 Levenick JM, Gordon SR, Sutton JE, Suriawinata A, Gardner TB. A comprehensive, case-based review of groove pancreatitis. *Pancreas* 2009; 38: e169-175
- 44 Lin Y, Tamakoshi A, Matsuno S, Takeda K, Hayakawa T, Kitagawa M, Naruse S, Kawamura T, Wakai K, Aoki R, Kojima M, Ohno Y. Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol* 2000; 35: 136–141
- 45 Ling S, Feng T, Ji K, Tian Y, Li Y. Inflammation to cancer: The molecular biology in the pancreas (Review). *Oncol Lett* 2014;
- 46 Marchbank T, Freeman TC, Playford RJ. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Distribution, actions and possible role in mucosal integrity and repair. *Digestion* 1998; 59: 167–174

- 47 Marks WH, Ohlsson K. Elimination of pancreatic secretory trypsin inhibitor from the circulation. A study in man. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 955–959
- 48 Mayerle J, Hoffmeister A, Werner J, Witt H, Lerch MM, Mössner J. Chronic Pancreatitis—Definition, Etiology, Investigation and Treatment. *Dtsch Ärztebl Int* 2013; 110: 387–393
- 49 Mohan V, Premalatha G, Pitchumoni CS. Tropical chronic pancreatitis: an update. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 337–346
- 50 Myriam Delhaye WVS. Belgian consensus on chronic pancreatitis in adults and children: statements on diagnosis and nutritional, medical, and surgical treatment. *Acta Gastro-Enterol Belg* 2014; 77: 47–65
- 51 Ogawa M, Shibata T, Niinobu T, Uda K, Takata N, Mori T. Serum pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) in patients with inflammatory diseases. *Adv Exp Med Biol* 1988; 240: 505–508
- 52 Ohmuraya M, Sugano A, Hirota M, Takaoka Y, Yamamura K. Role of Intra-pancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis. *Front Physiol* 2012; 3
- 53 Ohmuraya M, Yamamura K. Autophagy and acute pancreatitis: a novel autophagy theory for trypsinogen activation. *Autophagy* 2008; 4: 1060–1062
- 54 Olakowski M. Rola czynników wzrostu w patogenezie raka trzustki. Część II Transform Czynnik Wzrostu B TGF-B Czynnik Wzrostu Fibroblastów FGF Czynnik Wzrostu Nerwów NGF *Przegląd Gastroenterol* 2007; 2: 175–80
- 55 Olesen SS, Juel J, Graversen C, Kolesnikov Y, Wilder-Smith OHG, Drewes AM. Pharmacological pain management in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7292–7301
- 56 Otsuki M. Chronic pancreatitis in Japan: epidemiology, prognosis, diagnostic criteria, and future problems. *J Gastroenterol* 2003; 38: 315–326
- 57 Ozaki N, Ohmuraya M, Ida S, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Hirota M, Baba H. Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci* 2013; 20: 620–627
- 58 Paavonen J, Lehtinen M, Lehto M, Laine S, Aine R, Räsänen L, Stenman UH. Concentrations of tumor-associated trypsin inhibitor and C-reactive protein in serum in acute pelvic inflammatory disease. *Clin Chem* 1989; 35: 869–871

- 59 Pelaez-Luna M. PRSS1 and SPINK1 mutations in idiopathic chronic and recurrent acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 11788
- 60 Pfützner RH, Barmada MM, Brunskill APJ, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119: 615–623
- 61 Rahman SH, Verbeke CS, Gomez D, McMahon MJ, Menon KV. Pancreatico-duodenectomy for complicated groove pancreatitis. *HPB* 2007; 9: 229–234
- 62 Rätty S, Sand J, Laukkarinen J, Vasama K, Bassi C, Salvia R, Nordback I. Cyst fluid SPINK1 may help to differentiate benign and potentially malignant cystic pancreatic lesions. *Pancreatology* 2013; 13: 530–533
- 63 Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, Kovacs P, Teich N, Bödeker H, Keim V, Ruffert C, Mössner J, Kage A, others. CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut* 2013; 62: 582–592
- 64 Schneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, Cotton P, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, Lewis MD, Baillie J, Sherman S, Disario J, Burton FR, Gardner TB, Amann ST, Gelrud A, George R, Rockacy MJ, Kassabian S, Martinson J, Slivka A, Yadav D, Oruc N, Barmada MM, Frizzell R, Whitcomb DC. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2011; 140: 162–171
- 65 Schneider A, Löhr JM, Singer MV. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 101–119
- 66 Singer MV. Effect of ethanol and alcoholic beverages on the gastrointestinal tract in humans. *Romanian J Gastroenterol* 2002; 11: 197–204
- 67 Singh S, Choudhuri G, Agarwal S. Frequency of CFTR, SPINK1, and Cathepsin B Gene Mutation in North Indian Population: Connections between Genetics and Clinical Data. *Sci World J* 2014; 2014: 1–6
- 68 Spanier BWM, Dijkgraaf MGW, Bruno MJ. Trends and forecasts of hospital admissions for acute and chronic pancreatitis in the Netherlands. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 653–658
- 69 Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic Pancreatitis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1482–1490

- 70 Stenman U-H. SPINK1: A New Therapeutic Target in Cancer? *Clin Chem* 2011; 57: 1474–1475
- 71 Stenman U-H. Biomarker development, from bench to bedside. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015; 1–18
- 72 Stolte M, Zink W, Schaffner O. [Duodenal wall cysts and diseases of the pancreas]. *Leber Magen Darm* 1983; 13: 140–149
- 73 Sugita R, Furuta A, Yamazaki T, Itoh K, Fujita N, Takahashi S. Direct Visualization of Pancreatic Juice Flow Using Unenhanced MRI With Spin Labeling Can Be Aid in Diagnosing Chronic Pancreatitis. *Am J Roentgenol* 2014; 202: 1027–1034
- 74 Vasile D, Ilco A, Popa D, Belega A, Pana S. The surgical treatment of chronic pancreatitis: a clinical series of 17 cases. *Chir Buchar Rom* 1990 2013; 108: 794–799
- 75 Wang G-P, Xu C-S. Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010; 1: 85–90
- 76 Whitcomb DC. Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 46–52
- 77 Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141–145
- 78 Witt H, Luck W, Hennies HC, Claßen M, Kage A, Laß U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000; 25: 213–216
- 79 Zamboni G, Capelli P, Scarpa A, Bogina G, Pesci A, Brunello E, Klöppel G. Nonneoplastic mimickers of pancreatic neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 439–453
- 80 Zhu J, Wang L, Chu Y, Hou X, Xing L, Kong F, Zhou Y, Wang Y, Jin Z, Li Z. A new descriptor for computer-aided diagnosis of EUS imaging to distinguish autoimmune pancreatitis from chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2015; 82: 831–836.e1

8 STRESZCZENIE

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) jest chorobą charakteryzującą się nieodwracalnymi zmianami morfologicznymi w postaci postępującego uszkodzenia tkanki zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczej. Istotną rolę w patogenezie PZT odgrywa trzustkowy inhibitor wydzielania trypsyny (SPINK 1). Białko SPINK-1 pozwala na unieczynnienie ok. 20% uaktywnionej trypsyny. Stanowi tym samym jedną z barier chroniących przed samotrąwieniem komórek pęcherzykowych trzustki. Uważa się, że białko SPINK 1 wykazuje ochronną rolę w zapaleniu trzustki przez podwójne działanie: jako bezpośredni inhibitor trypsyny oraz przez hamowanie procesu autofagii. Natomiast jego podobieństwo do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) może być przyczyną zwiększonego ryzyka transformacji nowotworowej komórek gruczołowych trzustki.

Celem pracy było określenie czy oznaczenie stężenia białka SPINK 1 może być dodatkowym parametrem ułatwiającym wybór właściwej metody leczenia: chirurgicznej bądź endoskopowej. Ponadto czy oznaczanie stężenia białka SPINK 1 może być parametrem potwierdzającym skuteczność zastosowanego leczenia.

Do badania włączono 30 chorych leczonych chirurgicznie (A) oraz 28 leczonych endoskopowo (B). Krew pobierano przed planowanym a następnie po 6 miesiącach w trakcie wizyty kontrolnej. Oznaczanie stężenia białka SPINK 1 przeprowadzono metodą ELISA z wykorzystaniem komercyjnego Human ELISA Kit for SPINK1(USCN Life Science Inc, USA). Dodatkowo określono obecności mutacji *SPINK 1* u wszystkich chorych. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu oprogramowania SPSS wersja 23.

Moc testu w przeprowadzonym badaniu osiągnęła akceptowalny poziom 0,85. W grupie (A) średnie stężenie białka SPINK 1 przed leczeniem wyniosło 46,88 ($\pm 63,6$) ng/mL. Po leczeniu w 6-miesięcznej obserwacji odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia. W przypadku pacjentów z grupy (B) wyjściowe stężenie wyniosło 16,55 ng/mL, po 6 miesiącach nie odnotowano istotnego statystycznie spadku stężenia SPINK 1. Obecność mutacji stwierdzono u 2 pacjentów (co stanowiło ok. 3% badanej populacji).

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że na podstawie stężenia białka SPINK 1 można odpowiednio zakwalifikować pacjentów do właściwej metody leczniczej. Ponadto spadek stężenia w dobry sposób koresponduje ze skuteczno-

ścią podjętej interwencji chirurgicznej. W świetle badań eksperymentalnych obniżenie stężenia białka SPINK 1, może odgrywać protekcyjną przed transformacją PZT w raka trzustki.

9 SUMMARY

Chronic pancreatitis (CP) is a common disease characterized by progressive, destructive, and inflammatory process of multifactorial etiology, that leads to impairment of exocrine and endocrine functions of the organ. There are some suggestion indicating an important role of pancreatic secretory trypsin inhibitor also known as serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK 1) in the pathogenesis of CP. SPINK 1 protein is thought to inhibit up to 20% of potential trypsin activity. Recent studies showed that SPINK1 is also involved in self-regulation of acinar cell phagocytosis, proliferation and play role as growth factor. Therefore SPINK 1 has protective roles in pancreatitis by dual mechanisms, one as a trypsin inhibitor and second as a suppressor of autophagy. On the other hand similarities between SPINK 1 and EGF may provoke higher risk of neoplastic transformation of the pancreas.

The aim of the study was to evaluate changes in protein SPINK 1 concentration in the serum of patients with chronic pancreatitis that underwent surgical decompression of pancreatic duct (PD). This parameter was determined before the planned treatment and 6 months after operation. The study evaluated the same parameters in the control group of patients treated for the first time with endoscopic decompression. Another target was to evaluate the clinical efficacy of treatment based on generally accepted factors such as diarrhea, weight gain and pain score.

In presented study there were two groups: surgical intervention (A n=30) and endoscopic intervention (B n=28). The serum SPINK 1 protein concentration was determined with commercial Human ELISA Kit for SPINK1 (USCN Life Science Inc, USA). Blood samples were taken from two groups of patients; undergoing endoscopy and surgery one day before procedure and 6 months after treatment. Due to possible changes in protein concentration of SPINK 1 in the presence of gene mutation in all patients mutations N34S studies were done. IBM SPSS statistics version 23 was used for making calculation.

The post hoc power test resulted in a power of 0.85. In group A the decrease in SPINK1 level was significant ($p < 0.05$). In group B there is no significant ($p = 0.995$) change in the SPINK 1 level before/after treatment. In group A there was a significant difference in BMI, before and after treatment ($p < 0.0001$). In group B no significance was found ($p = 0.050$). The pain score between group A and B do not differ significantly before and after treatment ($p = 0.437$ vs $p = 0.417$). The

reduction in pain score in both groups before and after treatment decreases significantly ($p < 0.001$).

Analysis of the protein SPINK1 concentration before treatment, showed that its level in patients treated surgically was significantly higher than in patients treated with endoscopy. This shows that classification for treatment was correct. In group A we observed significant decrease in the concentration of protein SPINK 1. This may indicate the effectiveness of the undertaken interventions. In group B treated endoscopically, initial concentration of SPINK 1 protein was low, controlling SPINK 1 concentration after the intervention has no prognostic value. In the scope of recent publications, the reduction of SPINK 1 protein concentration may play a protective role in transformation into the pancreatic cancer.

10 ANEKS

KARTA INFORMACYJNA

dotycząca projektu:

Stężenie białka SPINK-1 u chorych leczonych z powodu przewlekłego zapalenia trzustki.

Szanowna Pani/Panie,

Obecnie realizujemy projekt naukowy, który przysłużyć się może w opracowaniu lepszego algorytmu postępowania w przewlekłym zapaleniu trzustki. W związku z tym prosimy Państwo o wyrażenie zgody na oddanie 5 ml swojej krwi. Próbkę krwi do celów badawczych będzie pobierana podczas hospitalizacji Pani/Pana na oddziale, w czasie wykonywania rutynowych oznaczeń krwi bez konieczności dodatkowego nakłucia żyły.

Oddana przez Państwa krew będzie podlegała analizie pod kątem zawartości białka SPINK-1 stanowiącego czynnik ochronny w procesie zapalenia trzustki. Wszystkie prace związane z obróbką i analizą otrzymanego materiału biologicznego będą przeprowadzane w centralnym laboratorium UCK. Celem badań jest zdobycie wiedzy niezbędnej do oceny skuteczności metod leczenia w przewlekłym zapaleniu trzustki.

Jednocześnie zapewniamy, ochronę Państwa danych osobowych i przechowywanie informacji o wynikach badań jedynie w formie anonimowej.

Z poważaniem,

Zespół badawczy
Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Na wszelkie dodatkowe pytania informacji odpowiedzi udzieli Państwu lekarz prowadzący lub prosimy o kontakt:
Lek. Andrzej Rafał Hellmann
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej
Tel. 58- 349-30-22
Ul. Smoluchowskiego 17, 80-952 Gdańsk

Ryc. 19. Karta informacyjna

Fig. 19. Information sheet

**FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY PACJENTA
NA UDZIAŁ W BADANIU**

Pełna nazwa programu badawczego: „Stężenie białka SPINK-1 u chorych leczonych z powodu przewlekłego zapalenia trzustki.”

Nazwisko i imię chorego.....
Data urodzenia.....Wiek.....Płeć.....
Adres.....
Telefon.....
Nazwa Kliniki/Oddziału.....
Imię i nazwisko lekarza.....

Ja, niżej podpisany/-a, wyrażam zgodę na wykorzystanie do celów badawczych 5 ml mojej krwi pobranej podczas hospitalizacji w Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej oraz Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz w czasie kontroli w poradni przyklinicznej .

Oświadczam, iż zapoznałam/em się z charakterem i celem badań opisanych w Karcie Informacyjnej, a także możliwością uzyskania dodatkowych informacji ,w każdej chwili opisanych w Karcie Informacyjnej.

.....
(Data i podpis pacjenta)

.....
(Data i podpis lekarza)

Ryc. 20. Formularz świadomej zgody pacjenta
Fig. 20. *Informed consent*

Data i godzina:

IMIE I NAZWISKO :		
PESEL:		
Wzrost [cm]:	Waga obecnie [Kg] :	Waga przed leczenie [Kg]:
Kiedy [rok] nastąpiły pierwsze objawy choroby:		
Rok rozpoznanie PZT:		
Rok pierwszego leczenia (endoskopia lub chirurgia):		
Etiologia (przyczyna) PZT: ALKOHOL/ KAMICA ŻÓŁCIOWA/ MIESZANA/ RODZINNA/ INNE:		
Spożycie alkoholu; w wywiadzie: TAK/NIE , Obecnie: TAK/NIE		
Kamica żółciowa: TAK/NIE, PAPIEROSY: w przeszłości: TAK/NIE, obecnie: TAK/NIE paczkolata:.....		
CUKRZYCA: TAK/NIE OD ILU LAT: WYMAGA: INSULINY/ LEKÓW DOUSTNYCH/ BEZ LECZENIA		
BIEGUNKI: TAK/NIE , ILE DZIENNIE:..... , OD KIEDY: PO LECZENIU USTĄPIENIE: TAK/NIE		
KREON obecnie: TAK/ NIE dawka:..... J , przed leczeniem: TAK/NIE dawka:j.		
BÓL , obecnie silny ból; TAK/NIE , przed operacją: TAK/NIE		
W skali od 1-10 gdzie 10 to ból nie do wytrzymania; przed leczeniem bolało: [] , a obecnie: []		
Leki przeciwbólowe: przed leczeniem TAK/NIE, razy na dzień..... ; nazwa leku: po leczeniu TAK/NIE, razy na dzień....., nazwa leku:		
Ogólna ocena efektu leczenia: BARDZO DOBRZE, DOBRZE, DOSTATECZNIE, NIEZADOWALAJĄCO, BARDZO ŻŁE		
Praca: AKTYWNY ZAWODOWO/ RENCISTA/ EMERYT/ BEZROBOTNY		
Codzienna sprawność : przed operacją: BARDZO DOBRA/DOBRA/ DOSTATECZNA/NIEZADOWALAJĄCA/ ZŁA po operacji: BARDZO DOBRA/DOBRA/ DOSTATECZNA/NIEZADOWALAJĄCA/ ZŁA		

Ryc. 21. Ankieta oceny skuteczności leczenia

Fig. 21. Questionnaire to evaluate the effectiveness of treatment