

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Иван Радосављевић

**УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЗА ПАНКРЕАСНЕ
ПРОТЕИНЕ И ФАКТОРЕ НЕКРОЗЕ ТУМОРА НА ТОК
АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2018. година

САДРЖАЈ

1. УВОД	4
1.1. Историјат.....	4
1.2. Анатомија и функција панкреаса.....	6
1.3. Дефиниција, инциденца и епидемиологија акутног панкреатитиса	7
1.4. Етиологија акутног панкреатитиса.....	8
1.5. Патофизиологија акутног панкреатитиса	10
1.6. Клиничка слика и клиничка дијагноза	13
1.7. Дефиниције Атланта класификационог система	15
1.8. Генетика акутног панкреатитиса	18
1.8.1. Полиморфизам гена за панкреасне протеине	20
1.8.1.1. Катјонски трипсиноген (PRSS1)	21
1.8.1.2. Инхибитор панкреасног трипсина (SPINK1)	26
1.8.1.3. Трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (CFTR)	29
1.8.2. Полиморфизам гена за факторе некрозе тумора	38
1.8.2.1. Полиморфизам гена за фактор некрозе тумора α (TNF- α).....	39
1.8.2.2. Полиморфизам гена за фактор некрозе тумора β (TNF- β).....	46
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	50
2.1. Циљеви студије.....	50
2.2. Хипотезе студије	50
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	51
3.1 Врста студије	51
3.2. Популација која се истраживала.....	51
3.3. Узорковање	53

3.4. Варијабле мерене у студији.....	53
3.5. Снага студије и величина узорка	54
3.6. Методе генотипизације.....	55
3.6.1. <i>PRSSI</i> генотипизација	55
3.6.2. <i>SPINK1</i> генотипизација.....	57
3.6.3. <i>CFTR</i> генотипизација	58
3.6.4. <i>TNF-α</i> генотипизација	60
3.6.5. <i>TNF-β</i> генотипизација	62
3.7. Статистичка обрада података.....	63
4. РЕЗУЛТАТИ.....	64
4.1. Полиморфизми <i>PRSSI</i> гена	69
4.2. Полиморфизам <i>SPINK1</i> гена	72
4.3. Полиморфизми <i>CFTR</i> гена	74
4.4. Полиморфизми <i>TNF-α</i> и <i>TNF-β</i> гена	84
5. ДИСКУСИЈА.....	89
5.1. <i>PRSSI</i> ген	90
5.2. <i>SPINK1</i> ген	93
5.3. <i>CFTR</i> ген.....	96
5.4. <i>TNF</i> гени.....	105
5.4.1. <i>TNF-α</i> ген.....	105
5.4.2. <i>TNF-β</i> ген	111
6. ЗАКЉУЧАК	113
7. РЕФЕРЕНЦЕ	114

1. УВОД

1.1. Историјат

За настанак болести панкреаса су одговорни многобројни чиниоци. Узроци, настанак и развој болести, лечење и исход су кроз историју човечанства били предмет разматрања и проучавања с циљем разумевања патологије и што ефикасније борбе са истом. То показује и доле наведени хронолошки след многобројних научних открића кроз векове још од пре нове ере.

Табела 1. Хронолошки приказ открића у вези са панкреасом

Herophilus of Chalcedon	334-280 п.н.е.	забележено је постојање панкреаса (1)
Ruphos of Ephesus	100 н.е.	први увео назив панкреас („сав од меса“) и мислио да је део оментума (2, 3)
Galen	131-200 н.е.	описао је панкреас као жлездано ткиво, и дефинисао артеријску и венску васкуларизацију панкреаса (1)
Andreas Vesalius	1541	сложио се са Galenom да је панкреас жлездано ткиво, а није се сложио са Ruphos-ом да је део оментума, већ да има заштитну функцију желуца (служи као јастук) (4)
Wirsung	1642	открио ductus pancreaticus Wirsungi (5)
Nicholaes Tulp	1652	први је дао клинички опис акутног панкреатитиса (6)
John Conrad Brunner	1653-1727	истакао да су посебне дуоденалне жлезде главни извор дигестивног сока, а да панкреас није важан за варење хране, нити виталан за живот (7, 8)
Giovanni Domenico Santorini	1681-1737	открио је d. pancreaticus accessorius Santorini (9)
Abraham Vater	1720	описао је дуоденалну ампулу (9)
Soemmering	1791	описао жлездану природу панкреаса (1)
Alexander Marcet	1815	открио липазу (10)
Fleischmann	1815	доводи у везу употребу алкохола са настанком панкреатитиса (3)
Karl von Rokitansky	1842	први препознао акутни хеморагични панкреатитис (11)

Bernard	1849-1856	извео неколико експеримената ради утврђивања улоге панкреаса у варењу хране (1)
Julius Klob	1860	извео неколико експеримената ради утврђивања улоге панкреаса у варењу хране (12)
Danilevsky	1872	открио постојање трипсина (1)
Kühne	1874	Изоловао трипсин (1)
Ruggero Oddi	1887	показао је постојање Одијевог сфинктера (13)
Fitz	1889	први је детаљно описао акутни панкреатитис (14), дао је предност конзервативном лечењу у односу на оперативно у раном периоду, те да је свако оперативно лечење у почетку болести опасно (15).
Hans Chiari	1896	дао је улогу панкреасним ензимима у настанку панкреасне некрозе и предложио је теорију аутодигестије панкреаса трипсином при чему га активира жуч као што је и Claude Bernard претходно предложио или алтернативно ентерокиназама као што је Nicholas Petrovich Shepovallnikov сугерисао 1889-те (16)
Simon Flexner	1897	претпоставио је да до некрозе масног ткива доводи липаза (12)
Bayliss, Starling	1902	открили секретин (17)
G. Gray-Turner	1920	описао дисколорацију у регији бока као знак хеморагичне форме акутног панкреатитиса (18)
Elman	1927	увео тест одређивања амилазе у серуму код акутног панкреатитиса (19)
Cherry-Crandall, Comfort	1932, 1935	увели одређивање специфичнијег ензима липазе у серуму у постављању дијагнозе акутног панкреатитиса (20, 21)
Clagett	1944	неуспешно лечио панкреатитис тоталном панкреатектомијом (1)
Watts	1963	успешно лечио акутни фулминантни панкреатитис тоталном панкреатектомијом (1)
Интернационални симпозијум	1963	уведена је класификација акутног панкреатитиса на основу морфологије, а 1992. уведена Atlanta класификација (22) која је 2012. ревидирана (23)
Doubilet and Mulholland	1965	увели сфинктеротомију за лечење акутног панкреатитиса (1)
Ranson	1974	увео је дијагностичке критеријуме за процену тежине акутног панкреатитиса (24, 25)
Balthasar	1985	увео је скоровање акутног панкреатитиса на основу скенерске процене некрозе панкреаса (26)
Beger et al.	1988	описали некрозектомију у лечењу акутног панкреатитиса (1)

1.2. Анатомија и функција панкреаса

Реч панкреас потиче од грчких речи *pan* – све, *kteas* – месо (2, 3). Панкреас је фиксирани секундарно ретроперитонеални орган који се састоји из главе, *processus uncinatus*, врата, тела и репа (27). По својој анатомској позицији лежи између дуоденума са десне стране и слезине са леве стране. Ни један други орган није тако окружен многобројним анатомским ентитетима укључујући желудац, дуоденум, јејунум, слезину, леви бубрег, леву надбубрежну жлезду, десни уретер, попречни колон и мезоколон. Изузетно добро васкуларизован обавља ендокрину и егзокрину функцију. Највећи део масе панкреаса припада егзокрином делу, чак 85% (28). Он координисаним радом у садејству са ендокриним делом (*Langerhans*-ова острвца) обезбеђује регулисани *feed-back* систем који омогућава лучење дигестивних ензима и хормона, и тако одређује тип варења и његову брзину. Састоји се од ацинуса и панкреасног дукталног система који одводи бистар алкални панкреасни сок у дуоденум кроз малу и велику папилу дуоденума. Панкреасни дуктални систем се састоји из главног панкреасног канала који се грана на интерлобуларне дуктусе, они на интралобуларне дуктусе, који се са ацинусима спајају преко интеркалатних дуктуса.

Панкреасни сок који у себи садржи бикарбонате, као и ензиме за варење угљених хидрата, липида и протеина (амилаза, липазе и протеазе), лучи се у просеку свакодневно у количини 500-800 ml (29), а може и до 2000 ml (30).

1.3. Дефиниција, инциденца и епидемиологија акутног панкреатитиса

Акутни панкреатитис представља гастроинтестинално обољење које се карактерише акутно насталим запаљењем панкреаса које је удружено са мало или нимало фиброзе (28, 31). Настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и превремене активације протеолитичких проензима (32). Одликује се варијабилним захватањем околних ткива и удаљених органских система (22). Акутни панкреатитис (трајање до 6 месеци) може прогредирати преко акутног рецидивирајућег панкреатитиса (више од једне епизоде акутног панкреатитиса) до хроничног панкреатитиса (> 6 месеци), који се даље може компликовати настанком карцинома панкреаса (33, 34). Дакле, у савременој патофизиологији акутног панкреатитиса се он види као догађај, а хронични панкреатитис као процес (32). Цео процес се објашњава тзв. SAPE (Sentinel Acute Pancreatitis Event) хипотезом где најмање три напада акутног панкреатитиса (тзв. multiple-hit теорија) узрокују настанак хроничног панкреатитиса. У случајевима где акутни рецидивирајући панкреатитис прогредира у хронични, кроз некроза-фиброза секвенцу долази до појаве фиброзно измењеног панкреаса и губитка његове жлездане функције (35).

Инциденца акутног панкреатитиса широм света се креће од 5 до 80 на 100 000 становника, а највећа је у Финској и САД (36). Инциденца је у сталном порасту (37). Тако је инциденца порасла са 14,8 /100 000 (1990-1994) на 31,2/100 000 (2010-2013) код мушкараца, и са 14,5 на 28,3/100 000 (2010-2013) код особа женског пола (38). У САД је од 2000. године до 2012. године инциденца порасла за 30% (39). Дакле, разлике постоје и по полу, али и по етничкој припадности. Тако у САД инциденца код урођеника износи 4/100 000, код белаца 5,7/100 000, а код црнаца 20,7/100 000 (40). Иначе, акутни панкреатитис је у САД најчешћа отпусна гастроинтестинална дијагноза (27119 пацијената у 2009. години) што објашњава трошкове лечења од 2,6 милијарди долара годишње (39). Ради се о болести која је на 14. месту по фаталности уопште, а 9-та по смртности из области немалигне патологије дигестивног тракта (28). Морталитет у зависности од степена тежине може бити и до 50% (23, 41-46). Пацијенти са лаким формом акутног панкреатитиса обично буду хоспитализовани у трајању до недељу дана, док се пацијенти са тешком формом могу лечити и недељама и месецима.

1.4. Етиологија акутног панкреатитиса

Етиолошки фактори акутног панкреатитиса су многобројни. Калкулоза жучне кесе је узрочник код 35-40% случајева акутног панкреатитиса, а алкохол у 30% (12). Поред њих се наводе са мањом учесталошћу, али не без значаја: у 2-5% хиперлипидемија, наслеђе, хиперкалциемија, у <1% траума (спољашња, хируршка, ERCP – ендоскопска ретроградна холангиопанкреатографија у 5-10% оних код којих се уради), исхемија, ретко опструкција панкреасних канала (неоплазме у 1-2%, *Pancreas divisum*, лезије дуоденума и Ватерове ампуле), инфекције (<1%), отрови, паразити, медикаменти у <5% (тиазидни диуретици, фуросемид, естрогени, сулфонамиди, тетрациклини, азатиоприн, 6-меркаптопурин, нитрофурантоин, валпроична киселина, инхибитори ацетил-холин естеразе, пропофол) (28, 47). Без обзира на свакодневно увећање сазнања о акутном панкреатитису, ипак постоји и једна група пацијената код које још увек није откривен узрочник болести, а њихова заступљеност износи приближно 5 - 10% и ту је реч о идиопатском панкреатитису (48). Код овог типа панкреатитиса се не може искључити деловање неког од наведених узрочника само зато што он није идентификован (28), већ се вероватно ради о комплексном деловању мултиплих етиолошких фактора, и то на бази генског полиморфизма који може повећати осетљивост панкреаса на развој инфламаторног одговора након деловања одређеног узрочника (47, 49).

С обзиром на генетику као један од узрочника, који може уз деловање и других етиолошких фактора утицати на појаву и ток болести, важно је са практичног становишта направити разлику између херeditарног и фамилијарног панкреатитиса, а пре свега због генетског саветовања и спровођења превенције, али и због раног постављања дијагнозе и прогнозе тежине болести, ради адекватне терапије. (50).

Фамилијарни панкреатитис се дефинише као панкреатитис који се догоди у одређеној породици, настао деловањем било ког етиолошког фактора (негенетског и/или генетског), са инциденцом која је већа од инциденце спорадичног догађаја (31).

Херeditарни панкреатитис се дефинише као панкреатитис присутан код две или више индивидуа у две или више генерација једне породице (аутозомно доминантно наслеђивање) (31).

Дакле, на настанак, тежину и исход овог обољења, поред многих других етиолошких фактора, у одређеној мери може утицати и генетска предиспозиција. Наиме, познато је да у патогенези акутног панкреатитиса значајну улогу имају панкреасни протеини и медијатори запаљења. Неки од њих испољавају генски полиморфизам, што значи да се гени који их кодирају у популацији могу наћи у више различитих облика, односно алела. Тако поједине варијације ових гена, тј. њихово присуство или одсуство, код пацијента са акутним панкреатитисом могу представљати фактор ризика за развој тешке клиничке слике и неповољан исход, зато што могу испољити ефекат на инфламаторни одговор панкреаса (51-53). У најзначајније полиморфне протеине са потенцијалом утицаја на развој и ток акутног панкреатитиса се, поред осталих, могу убројити катјонски трипсиноген (32), инхибитор панкреасног трипсина (32, 54) и трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (32, 55) као панкреасни протеини, као и фактори некрозе тумора α и β (51, 53, 55, 56), који спадају у медијаторе запаљења.

1.5. Патофизиологија акутног панкреатитиса

Акутни панкреатитис је болест са различитом клиничком варијабилношћу идући од лаке ка тешкој форми болести. Запаљенски процес може бити ограничен на сам панкреас или се ширити на друга околна ткива или пак на удаљене органске системе, и тако проузроковати различите степене тежине болести са различитим исходом лечења. Узроци су мултифакторијални. Данас преовлађује мишљење да акутни панкреатитис започиње активацијом проензима (зимогена) у панкреасу тј. у самој ацинусној ћелији панкреаса, што доводи до оштећења ћелије. Након тога следе догађаји који управо и одређују степен тежине болести, тј. да ли ће се развити лака или тешка форма болести (57). Ови догађаји подразумевају регрутацију инфламаторних ћелија и њихову активацију, као и стварање и ослобађање цитокина и других хемијских медијатора инфламације.

Ради разумевања комплексног патофизиолошког процеса настанка акутног панкреатитиса, поменућемо да постоје две групе механизма за заштиту панкреаса од аутодигестије – механизми који спречавају активацију трипсина и они који ограничавају оштећење активираниог трипсина (58, 59).

Прву групу, која подразумева спречавање претварања трипсиногена у трипсин, чине: 1) стварање ензима у неактивном облику проензима, 2) физички одвојена активација трипсиногена ентерокиназом у дуоденуму, а не у панкреасу, 3) одвојеност зимогена од лизозомалних ензима који могу активирати трипсиноген, 4) одржавање ниске концентрације калцијума у ћелији.

Другу групу механизма од заштите дејства активираниог трипсина чине: 1) присуство SPINK1 (енгл. serine protease inhibitor Kazal type 1) у везикулама које садрже трипсиноген, 2) аутолиза трипсина, 3) синтеза серумских протеина инхибитора трипсина – α 1-антитрипсин и β 2-микроглобулин који могу инактивирати трипсин који из панкреаса уђе у циркулацију и 4) секреција активираних ензима.

Улога интраацинусне активације трипсиногена у трипсин у патогенези акутног панкреатитиса је показана студијом (60). Један од најзначајних облика 3 изоензима трипсиногена у панкреасу је катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen, PRSS1), чијом активацијом у дуоденуму у присуству ентеропептидазе долази до отцепљивања пептида са 8 аминокиселина у низу (Ala-Pro-Phe-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (61). Равнотежа

између активације трипсина и његове деградације зависи од концентрације Ca^{2+} и активности панкреасног ензима химотрипсиногена Ц (енгл. chymotrypsinogen C). При високим вредностима Ca^{2+} у дуоденуму, химотрипсин Ц олакшава аутоактивацију трипсиногена, док при ниским концентрацијама Ca^{2+} у нижим деловима танког црева промовише деградацију трипсина (62). Дакле, у нормалним условима се ензими панкреаса продукују као неактивни прекурсори звани проензими или зимогени, који се транспортују и секретују ван панкреаса у дуоденум. Уствари, испирање панкреасних ензима из панкреаса директно у дуоденум, зависи од количине панкреасног сока који се лучи, а главни фактор укључен у то је заправо лучење бикарбоната кроз CFTR канале на епителним ћелијама панкреасних канала који за собом повлаче воду, и уз то врше алкализацију панкреасног сока, спречавајући на ова два начина да се развије акутни панкреатитис. Зато је очувана функција CFTR канала изузетно важна у превенцији настанка акутног панкреатитиса. Када зимогени буду допремљени у лумен дуоденума, тада се под дејством ентерокиназа активира трипсиноген у трипсин, који потом у каскадној реакцији активира и остале проензиме (28). Према томе, место продукције и активације проензима панкреаса се разликује, и управо то представља први ниво заштите панкреаса од аутодигестије. Следећи ниво заштите је тај да су зимогени у ацинусној ћелији одвојени мембраном од цитоплазме ћелије. Трећи ниво заштите панкреаса представља стварање инхибитора трипсина (PSTI - pancreatic secretory trypsin inhibitor, SPINK 1), који у нормалним условима инхибира дејство мале количине превремено активираниог трипсиногена.

Почетак акутног панкреатитиса се објашњава превременом активацијом зимогена у самој ћелији, а механизам који доводи до интрапанкреатичне активације зимогена се описује „хипотезом ко-локализације“ (63). Она подразумева да оштећујући стимулус делује на ацинусну ћелију, долази до пораста интрацелуларног калцијума, зимогени се ко-локализују са цитоплазматским вакуолама које садрже лизозомалне ензиме попут катепсина Б (CTSB). Катепсин Б активира трипсиноген (64) у трипсин, а онда трипсин доводи до повећане пропустљивости мембране заједничке вакуоле, што омогућава излазак катепсина Б у цитоплазму ацинусне ћелије. Он доводи до повећања пропустљивости мембране митохондрија из којих излази цитохром Ц у цитоплазму, што покреће каскадну реакцију апоптозе ацинусне ћелије. Локално оштећење привлачи неутрофиле и

протеолитичке ензиме, што даље доводи до оштећења панкреаса. Уз то макрофаги стварају и луче цитокине, пре свега фактор некрозе тумора α (енгл. tumor necrosis factor α , TNF α), интерлеукин 1 (IL 1) и интерлеукин 6 (IL 6), а они даље регулишу локални и системски инфламаторни одговор. Један од кључних проинфламаторних цитокина који започиње запаљенску каскаду је TNF- α (65) Он индукује своју експресију, као и експресију других проинфламаторних цитокина, и на тај начин амплификује инфламаторни одговор (66). TNF- α својим деловањем узрокује вазодилатацију, повећава микроваскуларну пермеабилност, активира леукоците, стимулише ослобађање других цитокина (67). Из исте групе цитокина је и TNF- β , који се везује за исте рецепторе као и TNF- α , али може испољити сличне или различите ефекте. Иако је механизам инфламације у потпуности непознат, ипак се TNF- β ефекат може довести у везу са септичним шоком код пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса (53). Описана је улога TNF- β у патогенези тј. раној фази инфламаторног одговора код хроничног аутоимуног панкреатитиса, да делује проинфламаторно као и TNF- α , тако што ослобађањем из ацинусних ћелија индукује експресију цитокина и хемокина, и регрутује инфламаторне ћелије ради започињања инфламације (68). Али за сада, колико нам је познато, нема публикација које описују детаљну улогу TNF- β у патогенези акутног панкреатитиса. Због повећане пермеабилности крвних судова услед дејства цитокина, долази до оштећења микроциркулације панкреаса, па последично и хипоperfузије панкреаса и стварања некрозе. У зависности да ли је патолошки процес испољен едемом панкреаса или долази до стварања некрозе, разликују се интерстицијски едематозни панкреатитис и некротизујући панкреатитис као тешка форма болести (28).

Када је у питању локална инфламација и настанак системске инфламације, показано је да су то процеси независни од активације трипсиногена у ацинусној ћелији (69). За прогресивно локално оштећење панкреаса и системску инфламацију која води у мултиорганско оштећење, може се рећи да је последица активације nuclear factor kappa beta (NF κ β) у самој ацинусној ћелији (69) која тече паралелно и независно од активације трипсиногена (69, 70). Активирани NF κ β регулише синтезу цитокина и утиче на регрутацију инфламаторних ћелија које даље увећавају и пропагирају системску инфламацију (28).

1.6. Клиничка слика и клиничка дијагноза

Акутни панкреатитис се карактерише акутним почетком јаког и константног бола у трбуху, и то најчешће у епигастријуму са појасним ширењем или без њега, али и дифузно у абдомену, уз евентуално попуштање бола након седења и савијања тела ка напред (71). Обично се уз бол јављају мучнина и повраћање.

Уопштено, серумска амилаза и липаза су повишене код акутног панкреатитиса, али с друге стране и не морају бити (72).

Секреција панкреасне амилазе у панкреасни сок је код акутног панкреатитиса смањена, тако да долази до екстравазације из панкреаса и ресорпције у системску циркулацију кроз венуле и лимфатике. Пораст серумске амилазе се очекује унутар 2 сата, а пик у првих 48 сати (73). Враћање на нормалне вредности кроз реналне и екстрареналне механизме се очекује за 3-5 дана (73). Осим код акутног панкреатитиса, најчешће се пораст амилаза јавља код перфорираног пептичког улкуса, интестиналне опструкције, мезентеријалне исхемије, билијарних болести (холециститис итд.). Остала стања која могу изазвати скок амилазе су ренална инсуфицијенција, дијабетесна кетоацидоза, акутна тровања алкохолом, метастазе у јетри, карцином плућа, траума главе, али и многе друге (73).

Пораст серумске липазе код акутног панкреатитиса се дешава истим механизмом као и код амилазе. Пораст липазе се дешава унутар 4-8 сати од почетка симптома, а пик се јавља унутар 24 сата (73). Уз то серумска липаза има дужи полуживот од амилазе, па се вредности липазе спорије враћају на нормалне вредности (8-14 дана). Слично хиперамилаземији, и вредности липазе се могу повећати код бројних интраабдоминалних и екстраабдоминалних стања, али у мањем броју у односу на амилазу и обично не више од 3 пута од горње границе референтног опсега

Важно је истаћи да вредности амилазе и липазе не корелирају са тежином акутног панкреатитиса, што би значило да се и много високе вредности поменутих ензима могу наћи код лаке форме болести, али исто тако могу остати у границама референтних вредности. Обично није потребно мерити вредности и једног и другог ензима. Липаза је сензитивнија и специфичнија, и за њу се радије одлучујемо. Свакодневно мерење серумске амилазе и/или липазе након постављања дијагнозе акутног панкреатитиса, а ради

процене прогресије болести и евентуално крајње прогнозе, је изгубило смисао и не саветује се (73). Однос липаза/амилаза се може искористити као средство за идентификовање алкохолне етиологије панкреатитиса ако је однос већи од 3, мада има радова који говоре о малој сензитивности ове алатке, с обзиром да се тиме може идентификовати само 2/3 пацијената са алкохолним акутним панкреатитисом (73).

Софистицирана визуализациона дијагностика која се уобичајено користи у постављању дијагнозе акутног панкреатитиса је компјутеризована томографија (СТ). Карактеристичан налаз подразумева увећање панкреаса са дифузним едемом, хетероехогеност паренхима панкреаса, перипанкреатична инфламација и перипанкреатичне течне колекције (72). Коришћењем интравенског контраста се може поставити дијагноза некрозе панкреаса. Неопходан критеријум је да се идентификује добро ограничена хипоехогена зона обично дензитета <50 HU (Hounsfield units, нормална ехогеност паренхима панкреаса 50-150 HU) дијаметра >3 cm или обухвата $>30\%$ паренхима панкреаса (74).

1.7. Дефиниције Атланта класификационог система

У Атланти (Џорџија, САД) је од 11. до 13. септембра 1992. године одржан тродневни Интернационални симпозијум са циљем увођења универзално прихватљивог клинички заснованог класификационог система за акутни панкреатитис (22). Дакле, циљ је био да се уведу интернационални стандарди дефиниција акутног панкреатитиса и његових компликација како би била могућа поређења тежине болести и резултата лечења, као и класификације пацијената за наредна истраживања.

Критеријуми за тежину акутног панкреатитиса укључују органску инсуфицијенцију (нарочито шок, плућна инсуфицијенција, ренална инсуфицијенција) и локалне компликације (акутна течна колекција, некроза, псеудоциста, апсцес). Према њима акутни панкреатитис има два облика, а то су лака и тешка форма.

Рани предиктори тешке форме у првих 48 сати су Ranson score ≥ 3 (25) и APACHE II score ≥ 8 (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) (75).

Ranson score се израчунава на почетку хоспитализације и у току иницијалних 48 сати, а различити су критеријуми за билијарни панкреатитис и за панкреатитис небилијарне етиологије. Тако се на самом почетку хоспитализације скорују године, број леукоцита ($/\text{mm}^3$), гликемија (mg/dL), серумска лактат-дехидрогеназа (IU/L) и серумска аспартат-аминотрансфераза (IU/L), и то редом >55 , >16000 , >200 , >350 и >250 за небилијарни панкреатитис; а за билијарни панкреатитис редом >70 , >18000 , >220 , >400 , >250 (25). Након 48 сати се за обрачунавање скорa користе смањење хематокрита (%), пораст урее (mg/dL), калцијум у серуму (mg/dL), артеријски PO_2 (mmHg), базни дефицит (mEq/L) и секвестрација течности (L) за небилијарни панкреатитис редом >10 , >5 , <8 , <60 , >4 и >6 ; а за билијарни панкреатитис редом >10 , >2 , <8 , $/$, >5 и >4 (25). Дакле, максималан број поена је 11, скорује се 11 параметара, а ≥ 3 указује на прогнозу да се ради о тешкој форми болести.

APACHE II score се израчунава скоровањем 14 физиолошких параметара (телесна температура, средњи артеријски притисак, срчана учесталост, дисајна учесталост, парцијални притисак кисеоника или алвеолоартеријска разлика у зависности од вредности инспираторне фракције кисеоника, артеријска рН вредност, натријум у серуму, калијум у серуму, креатинин у серуму, хематокрит, број леукоцита, Глазгов кома скала), старости

(године) и присуства тешке инсуфицијенције органа/органских система (хепатична, бубрежна, срчана, респираторна, имунодефицијенција) (75). Скор ≥ 8 прогностички указује на тешку форму болести.

С обзиром на широко коришћење прогностичких фактора (Ranson, APACHE II) за одређивање тежине болести (22), а за које се показало да су умерено прецизни (76-78) и са малом сензитивношћу за прогнозу компликованог акутног панкреатитиса (79), уведени су појмови „предвиђене“ и „стварне“ тешке форме акутног панкреатитиса (80). На овај начин се избегава да пацијенти који су прогностички груписани у тешку форму на крају буду класификовани као лака форма, јер се показало да мање од 50% пацијената класификованих као тешка форма према Атланта критеријумима, остане у групи стварно тешке форме болести (79, 81). Из тог разлога се добар део истраживача (80) одлучио да, у периоду пре објављивања ревидиране Атланта класификације, не користи прогностичке факторе (Ranson, APACHE II), већ дефинише тешку форму акутног панкреатитиса као ону која је удружена са органском инсуфицијенцијом и/или локалним компликацијама тј. некрозом, псеудоцистом или апсцесом панкреаса (22).

С друге стране, лака форма акутног панкреатитиса подразумева постојање минималне органске дисфункције уз враћање нарушене функције органа и одсуство локалних компликација (некроза, псеудоциста, апсцес) (22).

Органска инсуфицијенција се дефинише као шок (систолни крвни притисак $< 90 \text{ mmHg}$), плућна инсуфицијенција ($\text{PaO}_2 \leq 60 \text{ mmHg}$), бубрежна слабост (креатинин $\geq 177 \mu\text{mol/L}$ или $\leq 2 \text{ mg/dL}$ након рехидрације) и гастроинтестинално крвављење ($> 500 \text{ ml/24h}$) (22).

Акутна течна колекција у самом панкреасу или у његовој околини се јавља рано код акутног панкреатитиса као последица екстравазације, и код интерстицијског и некротизирајућег, а код највећег броја пацијената долази до спонтане регресије у периоду опоравка, док се код осталих формира псеудоциста или апсцес; увек је без зида од гранулационог или фиброзног ткива (22, 72, 80).

Некроза панкреаса представља фокалну или дифузну површину неживог паренхима панкреаса, типично са појавом перипанкреасне масне некрозе (22).

Акутна псеудоциста панкреаса се јавља 4 недеље након почетка акутног панкреатитиса и представља колекцију обично стерилног панкреасног сока добро ограђену неепителизованим ткивом (фиброзно или гранулационо ткиво) (22).

Панкреасни апсцес представља ограничену интраабдоминалну колекцију гноја, обично у близини панкреаса, садржи мало или нимало некротичног ткива, настаје као последица акутног панкреатитиса или трауме (22). Настаје обично 4 недеље након почетка симптома, и то инфекцијом псеудоцисте. Треба га разликовати од инфициране некрозе, јер је морталитет код инфициране некрозе двоструко већи (82).

1.8. Генетика акутног панкреатитиса

Један од бројних етиолошких фактора који доводе до настанка акутног панкреатитиса је генски полиморфизам. Познато је да генски полиморфизам заједно са факторима околине значајно доприноси настанку, тежини акутног панкреатитиса и његовом исходу (32, 83, 84). Генске варијације бројних протеина и инфламаторних медијатора укључених у процес патогенезе акутног панкреатитиса су удружене са настанком тешке клиничке слике и лошом прогнозом (49, 55, 85, 86).

Варијације гена који кодирају протеине укључене у патогенезу акутног панкреатитиса могу знатно утицати на количину, структуру и функцију кодираних протеина. Тако истраживања функционалних варијација гена (варијације које мењају функцију кодираних протеина) могу допринети бољем терапијском приступу болести са тежњом ка бољем исходу.

Честе варијације у секвенци ДНК представљају полиморфизми гена. Они су за генетску анализу од значаја када је учесталост варијантног алела већа од 1% у укупној популацији (87).

Дивљи тип алела (wild type, wt) означава онај алел који је или најчешћи, или први потврђен у популацији, и који кодира протеин чија се активност сматра референтном. Било који други тип алела који није дивљи тип (variant type, vt) је онај који се по структури секвенце, мада не неопходно и по активности кодираних протеина, разликује од референтног.

Најчешћи облик генске варијације у хуманој популацији представљају полиморфизми појединачних нуклеотида (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (88). Код њих долази до промене само једног нуклеотида у секвенци молекула ДНК. Јављају се како у кодирајућим регионима гена, тако и у некодирајућим, и то са сличном учесталашћу заступљености (89). Уколико се јаве у кодирајућем региону, онда доводе до промене структуре, а тиме и функције кодираних протеина. Они се у литератури обележавају јединственим „rs“ бројем (Reference SNP ID number).

Чак и када постоји генетска основа за развој одређене болести, та болест није увек клинички испољена, и тај феномен објашњава се пенетрантношћу. Пенетрантност се дефинише као проценат особа које имају генотип који повећава ризик од развоја одређене

болести, а уз то испољавају клиничке знаке тј. фенотип те болести (90). Тако комплетну пенетрантност (100%) имају они патогени генотипови код којих сваки носилац, уколико се ризик на време не препозна и не предузму одговарајуће мере, развије клиничке знаке болести. На пенетрантност утичу тзв. "cis-acting" елементи и "trans-acting" елементи. Први представљају секвенце DNA у близини гена који регулишу генску експресију, а други су гени који кодирају протеине који контролишу генску експресију. Такође, на пенетрантност могу утицати и пол и старост.

1.8.1. Полиморфизам гена за панкреасне протеине

Показано је да су полиморфизми бројних гена удружени са акутним (и хроничним) панкреатитисом, а међу њима и полиморфизми гена који кодирају панкреасне протеине задужене за нормално функционисање жлезде (катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе) (47, 91). Катјонски трипсиноген и инхибитор панкреасног трипсина су међу првим протеинима панкреаса који су истраживани на пољу генетске основе панкреатитиса (92, 93).

1.8.1.1. Катјонски трипсиноген (PRSS1)

Трипсиноген је један од главних протеина панкреаса који се активира отцепљивањем пептидног ланца на N-терминалном крају (94). Хидролизом трипсиногена настају трипсиноген активациони пептид (енгл. trypsinogen activation peptide, TAP) и активна ентеропептидаза – трипсин (95). У соку који панкреас лучи, могу се наћи 3 изоформна облика проензима трипсиногена. То су трипсиноген-1 тј. катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen; PRotease Serine type 1, PRSS1), који је најзначајнији; затим трипсиноген-2 тј. анјонски трипсиноген (PRSS2) и трипсиноген-3 тј. мезотрипсиноген (PRSS3) (61). Групи ензима под називом „серин протеаза“ припадају трипсин, хомотрипсин, еластаза, каликреин и други. Они се карактеришу реактивношћу серина на активном месту ензима (96). Хидроксилна група активног серина је укључена у брзе сукцесивне кораке ацилације и деацилације, што доводи до цепања пептидне везе суспстрата (протеина) и симултане регенерације ензима (96). Две трећине укупног трипсиногена чини PRSS1, трећину PRSS2, а мање од 5% мезотрипсиноген (32). Ова три изоензима се разликују по својим различитим одговорима на инхибитор трипсина (97), а такође и по изоелектричним тачкама (98), али имају сличности, тј. хомологни су у 87% (94). PRSS1 и PRSS2 имају идентичан број (247) аминокиселина у свом саставу, укључујући 27 аминокиселина за сигнални пептид и 8 аминокиселина за активациони пептид (96). Такође, имају скоро идентичну молекуларну масу: 24930 Da и 25002 Da (94). Мезотрипсиноген има молекуларну масу 25000 Da (96). Описује се и трипсиноген-4, који је мождани протеин, и уствари представља варијанту трипсиногена-3, јер је показано да је ген који их кодира исти, али због алтернативног сплајсинга транскрипта једног гена настају две варијанте rRNA које су ткивно специфичне (99). Разлика између ових двеју rRNA постоји у првом егзону, и то одређује ткивну специфичност протеина, а од 2. до 5. егзона, који иначе кодирају активну протеазу, су идентичне; свакако сличност кодирајућих секвенци ове две протеазе је 99,2% (99). Две најзначајније изоформе, катјонски и анјонски трипсиноген, разликују се по активационим пептидима који се ослобађају претварањем трипсиногена у трипсин (100). Трипсин из молекула трипсиногена настаје одвајањем изложеног кратког пептидног ланца названог трипсиноген активациони пептид (TAP), и то дејством ензима ентерокиназе или другог

молекула трипсина (32). Активацијом трипсиногена се одваја октапептид Ala-Pro-Phe-Asp-Asp-Asp-Lys, а код катјонског трипсиногена се уз то формира још и пентапептид Asp-Asp-Asp-Lys (61). Том приликом настаје активни облик ензима тј. трипсин, и то: трипсин-1, настао од PRSS1, и трипсин-2, настао од PRSS2. Трипсин игра кључну улогу у процесу варења, јер као „ензим окидач“ активира све друге проензиме панкреаса (96). Катјонски трипсин се, пре него анјонски трипсин и мезотрипсин, доводи у везу са херидитарним панкреатитисом (101), али и фамилијарним и спорадичним хроничним панкреатитисом (102). Заправо, варијације PRSS2 и PRSS3 се не доводе у везу са хроничним панкреатитисом (103-105). Трипсин представља главну панкреасну протеазу (серин протеаза), а састављен је из два глобуларна протеинска домена спојена једним бочним пептидним ланцем (50). Молекул трипсина, а самим тим и трипсиногена, има тзв. џеп у коме се везује калцијум, а који се налази у близини бочног пептидног ланца. У бочном пептидном ланцу, који се назива „петља за аутолизу“, се у позицији R122 нормално налази аминокиселина аргинин; то је главно место за напад од стране другог молекула трипсина који ензимским цепањем бочног пептидног ланца доводи до инактивације првог молекула трипсина тзв. процесом аутолизе (32). Како је петља за аутолизу флексибилна, то се лако R122 приближава џепу у коме се везује калцијум, па у условима повишеног нивоа калцијума долази до везивања истог у поменутом џепу, што заклања R122 и смањује изложеност ензимском нападу другог молекула трипсина (106, 107). Тако калцијум игра важну улогу у стабилизацији трипсина, а не само у његовој секрецији, јер у ацинусним ћелијама где је ниво калцијума низак, трипсин је склон аутолизи, али у средини где је ниво калцијума висок (панкреасни канали и дуоденум), трипсин је заштићен од аутолизе (32, 108). До активације трипсиногена може довести дејство трипсина, тај процес се назива „аутоактивација“ трипсиногена (102). Осим тога, аутоактивација катјонског трипсиногена се лакше и брже одиграва него што је то случај код анјонског, а објашњава се различитом засићеношћу калцијум-везујућих места у молекулу два трипсиногена (109). Исто тако, катјонски трипсиноген је отпорнији на аутолизу у односу на анјонски (101).

Функција поментих PRSS1 и PRSS2 је, у смислу протеолитичке активности, једнака, али ипак се сматра да је трипсин-2 мање стабилан и брже подлеже аутолизи од трипсина-1 у присуству већих концентрација калцијума (110), а уз то је подложнији

инхибицији (61). Трипсин, осим трипсиногена, активира и остале ензиме панкреаса, и још уз то се везује за протеазом активирани рецептори (енгл. protease-activated receptors; PARs). Оба трипсина потенцијално активирају PAR-2 који се налазе на луминалној страни ацинусних ћелија панкреаса, епителних ћелија панкреасних канала и у цреву (61). Њиховом активацијом се стимулише стварање цитокина; и тако по принципу негативне повратне спреге, трипсин регулише секрецију егзокриног панкреаса (61).

Када је у питању панкреасни сок код здравих, катјонски трипсиноген се у просеку лучи у дупло већој мери у односу на анјонски облик(111). Међутим, тај однос два главна облика проензима се у случају појаве обољења панкреаса (попут хроничног алкохолног панкреатитиса или карцинома панкреаса) смањи на око 0,45, тј. анјонског трипсиногена лучи се бар два пута више у односу на катјонски (111). Исто тако, студија је показала да се код акутног панкреатитиса количина секретованог анјонског трипсиногена увећава 50-80 пута (61, 112), а катјонског само 15 пута (61). Наравно, овако промењен однос два ензима може у дијагностичком смислу да укаже на поменути патологију панкреаса, а објашњава се повећаним лучењем анјонског трипсиногена.

Резимирано, PRSS1 се у односу на PRSS2 чешће доводи у везу са настанком панкреатитиса (101), што се објашњава већим лучењем PRSS1 (111), већом склоношћу ка аутоактивацији (109) и већој отпорности на аутолизу (101).

Гени који кодирају трипсиногене су протеаза серин гени (енгл. protease, serine; PRSS) (113). PRSS1 ген кодира катјонски трипсиноген, PRSS2 ген кодира анјонски трипсиноген, а трипсиноген-3 и трипсиноген-4, који је његова варијанта, кодира PRSS3 ген (61). PRSS1 ген се налази на дугом краку хромозома 7 (7q35) унутар локуса за бета Т ћелијски рецептор (енгл. β TCR); у свом саставу има приближно 3,6 kb и 5 егзона (113, 114).

Варијације PRSS1 гена се доводе у везу са аутолизом и/или превременом активацијом трипсиногена (115, 116). Варијације које су повезане са настанком херeditарног панкреатитиса регулишу процесе који зависе од химотрипсина Ц (енгл. chymotrypsin C, CTRC): активацију и деградацију катјонског трипсиногена (117). Комбинацијом ова два ефекта се постиже повећана активност трипсина која се доводи у везу са настанком панкреатитиса (118). CTRC је ензим који контролише ниво трипсина створеног аутоактивацијом трипсиногена. Он смањује ниво активног трипсина

промовисањем деградације трипсиногена у току његове активације, али и деградацијом трипсина.

У поменутом *CTRC*-зависном процесу, *CTRC* у трипсиногену раскида дипептидну везу Leu81-Glu82, а трипсин Arg122-Val123; ови прекиди дипептидних веза обично воде у деградацију *PRSS1*. На тај начин, *CTRC* деградацијом смањује активност трипсина насталу аутоактивацијом трипсиногена.

CTRC такође стимулише аутоактивацију *PRSS1* цепањем дипептидне везе Phe18-Asp19 у TAP-у и његовим скраћењем. Скраћени активациони пептид се чешће активира трипсином који раскида Lys23-Phe24 дипептидну везу.

У ствари, доминантни ефекат *CTRC* је деградација трипсиногена. *PRSS1* варијације удружене са класичним херeditарним панкреатитисом (као нпр. R122H, N29I, N29T, R122C) узрокују повећану активност трипсина блокањем деградације трипсиногена, а неке *PRSS1* варијације (као нпр. N29I, A16V) стимулацијом аутоактивације.

PRSS1 ген је јако полиморфан и до сада је познато више од 30 генских варијација (www.uni-leipzig.de/pancreasmutation). Студија која указује на повезаност настанка панкреатитиса и мутације *PRSS1* гена датира из 1996. године (92). Whitcomb et al.(114) су те године открили варијацију 365G>A (R122H) у трећем егзону *PRSS1* гена и сматрали је узроком херeditарног панкреатитиса. Према старој номенклатури се ова варијација обележавала као R117H (химотрипсиноген систем бројања), а данас са R122H (бројање започиње од ATG почетног кодона), иако се може обележити и са HPI (119). Годину дана касније су Gorry et al. (120) идентификовали још једну варијацију у *PRSS1* гену, и то у другом егзону у регији кодона 29 – 86A>T (N29I, HPII). Оба полиморфизма појединачних нуклеотида (SNPs) редукују природан процес инактивације трипсина (83, 84, 121). Имају високо изражену пенетрантност, и до 80% (101), тако да су то полиморфизми који су јако прихваћени када је у питању генетско тестирање код особа који показују одређену клиничку патологију (92). Осим што је заступљеност 365G>A варијације већа у односу на полиморфизам 86A>T, кроз више истраживања се дошло до закључка да пацијенти са 365G>A варијацијом чешће обољевају у ранијем животном добу у односу на носиоце 86A>T, али такође, доводе и до теже форме акутног панкреатитиса (95, 122), па и да чешће у току лечења захтевају хируршку интервенцију (123).

Утицај варијација *PRSSI* на развој панкреатитиса и његов ток је различито испољен у различитим демографским подручјима (124-126). Према томе, и ефекат генетске основе на панкреатитис се разликује међу популацијама.

1.8.1.2. Инхибитор панкреасног трипсина (SPINK1)

Познато је да и у плазми и у панкреасу постоје различити инхибитори трипсина. Сви они имају своју улогу у патогенези различитих облика панкреатитиса. У плазми су описани α_2 - макроглобулин и α_1 - антитрипсин као инхибитори протеаза, а у панкреасном соку главни је инхибитор панкреасног трипсина (енгл. pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI i.e. serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1) (61). SPINK1 је инфламацијом индукован продукт ацинусних ћелија панкреаса (127) који специфично инхибира активност трипсина компетитивним блокирањем активног места трипсина (28). SPINK1 се може наћи и у другим ткивима, а не само у панкреасу (128-130), па и код панкреатектомисаних особа (131). Ово указује на то да ацинусне ћелије панкреаса нису једини извор инхибитора панкреасног трипсина. У ацинусним ћелијама панкреаса се ствара заједно са трипсиногеном, и у свом саставу има 56 аминокиселина распоређених у линеарни полипептидни ланац (132). Овај пептидни ланац је молекуларне масе око 6500 и има три дисулфидна моста: Cys⁹-Cys³³, Cys¹⁶-Cys³⁵, and Cys²⁴-Cys⁵⁶ (133). Поређења ради, најизраженија хомологија са грађом хумане (134) SPINK1 је код говечета (133), док је сличност у грађи SPINK1 код човека и свиње (135) 71% (39/56 аминокиселина), а у поређењу са пацовом (136) 64% (36/56 аминокиселина). У везикулама које садрже трипсиноген се налази у петоструко мањој количини у односу на трипсиноген, и представља један од нивоа вишеструке заштите од превремене активације трипсиногена (95, 137). SPINK1 остварује протективну улогу у настанку панкреатитиса тако што својим реактивним местом служи као супстрат за везивање трипсина, па тако спречава трипсином-катализовану превремену активацију трипсиногена у ацинусима и дукталном систему панкреаса (138). Још давне 1953. године је показано да је комплекс трипсин - SPINK1 привремен, те да у недостатку инхибитора трипсина тј. у вишку присутног трипсина, комплекс трипсин - SPINK1 може бити супстрат за трипсин (139). У овом случају трипсин хидролизује створену ковалентну везу, и из поменутог комплекса ослобађа трипсин; ово значи да је могућа дезинхибиција трипсина и поновно враћање функције трипсина након блокаде SPINK1-ом (139). Инхибиција трипсина расте линеарно са порастом концентрације SPINK1, све док се 90% активности ензима не инхибира. Па чак и при вишку присутног инхибитора, врло ниска активност трипсина постоји, управо због дисоцијације комплекса трипсин- SPINK1(96).

Према томе, у случају да се у панкреасу догоди превремена активација трипсина, 20% ефекта трипсина у панкреасу може бити неутралисано (137), па се тако делом пружа отпор настанку панкреатитиса (115). Овакву заштиту од активности трипсина још у самим ацинусним ћелијама је потврдило више студија (32, 54, 84, 85). Варијације гена који кодира *SPINK1* углавном су *loss-of-function* варијације, зато што доводе до смањења функције *SPINK1*. С обзиром на улогу коју има у превенцији аутодигестије панкреаса, сматра се да носиоци оваквих генских варијација, који су оболели од акутног панкреатитиса, могу имати промењену тежину клиничке слике (83, 84), углавном делујући као модификујући фактор на друге етиолошке факторе (140). Свакако, *SPINK1* варијације се доводе у везу са настанком хроничног панкреатитиса (93), и то различитих етиологија – идиопатског, фамилијарног, тропског (93, 140-144), али се јавља и код акутног облика (125, 143). *SPINK1* је кодиран полиморфним геном који се налази на дугом краку 5. хромозома (5q32) и обухвата регион од приближно 7,5 kb, а у свом саставу има 4 егзона и 3 интрона (145). Овај ген кодира пептид од 79 аминокиселина, од којих 23 чине сигнални пептид; тако да се може рећи да *SPINK1* има 56 аминокиселина (93). До сада је препознато скоро 40 варијација овог гена (www.unileipzig.de/pancreasmutation). Његова најзапаженија варијација је SNP 101A>G, који заменом аденина гуанином на позицији 101 доводи до замене аспарагина серином у кодону 34 у егзону 3; N34S (93, 140, 146). Поређења ради, на овој позицији је серин нормално позициониран у пептидном ланцу свињског *SPINK1*, који иначе не доводи до инхибиције хуманог трипсина (96). Међутим, има извештаја који говоре супротно, тј. да свињски (не и говеђи) *SPINK1* инхибира хумани трипсин, али при моларном односу *SPINK1* према трипсину 1,5:1, док је код човека однос инхибитора и трипсина 1:1 (97). Кодон 34 се налази у близини реактивног места *SPINK1* (-Lys-Пе-), тачније 7 аминокиселина даље, тако да присуство серина у кодону 34 код човека утиче на функцију реактивног места *SPINK1* смањењем његове функције (93).

Ова варијација се поготово доводи у везу са пацијентима оболелим од хроничног панкреатитиса, али без породичне историје болести (32). Поређења ради, код херeditарног панкреатитиса 80% пацијената са само једном *PRSSI* варијацијом (R122H или N29I) ће развити панкреатитис, а код пацијената са хетерозиготном *SPINK1* варијацијом, <1% ће развити панкреатитис (32). Учесталост јављања *SPINK1* варијација у општој популацији је висока - 2% (140). Тако је учесталост N34S варијације 0,77% (140),

али код оболелих од хроничног панкреатитиса у просеку 9,7% (93, 140-144). Међутим, идиопатски панкреатитис се одликује присутношћу ове варијације код 15-40% случајева (140, 146). У једној студији се код оболелих од хроничног панкреатитиса, N34S варијација идентификовала у 25% пацијената, али је утврђено да од асимптоматских носилаца N34S варијације, само 1% испољи клиничку слику панкреатитиса (140). Аутори ове студије су закључили да N34S варијација није довољна да сама доведе до настанка панкреатитиса, већ делује као модификујући фактор другим етиолошким факторима и тако спушта праг неопходан за настанак панкреатитиса или чини клиничку слику тежом (140). Поменути 101A>G варијација је удружена са повишеним ризиком за акутни панкреатитис, а нарочито као кофактор у присуству других генетских фактора или фактора околине (32, 54, 84, 125, 147, 148). Ипак, има студија које 101A>G полиморфизам доводе у везу са рекурентним акутним панкреатитисом, али не и са првим нападом акутног панкреатитиса (149, 150). Тако је остављена могућност размишљања да је генетска основа код иницијалног и рекурентног облика акутног панкреатитиса различита.

SPINK1, било као главни узрок или кофактор у присуству других етиолошких фактора, утиче на клиничку слику и одређује ток којим се болест развија. Различите учесталости међу популацијама указују на то да поред директног генетског утицаја, и други фактори имају улогу у развоју панкреатитиса (124, 151-153). Да би се добила права слика о интеракцији *SPINK1* и других узрочника, пожељно је спровођење студија на што већем броју популација.

1.8.1.3. Трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (CFTR)

Трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) је велике масе (168 kDa)(154) панкреасни протеин који се налази у апикалној мембрани епителних ћелија малих проксималних панкреасних канала и центрoацинусним ћелијама (155) и има улогу у стварању панкреасног сока (156). Припада подфамилији C ABC транспортера (ATP-binding cassette transporter subfamily C, member 7, ABC7) (157). Састоји се од 1480 аминокиселина, од којих се 80% тј. 1164 аминокиселине налази интрацелуларно (154). То је мултифункционални протеин, који осим што служи као анјонски канал за транспорт хлорида и бикарбоната, такође има функцију у регулацији бројних других транспортера и физиолошких процеса попут егзоцитозе и ендоцитозе, експресије проинфламаторних цитокина и интрацелуларног рН (158). Зато његова дисфункција узрокује поремећај ћелијске хомеостазе (159).

Структурално је сачињен од регулаторног „R“ домена (R domain, RD), са 200 аминокиселина у свом саставу (160), који повезује две хомологне половине сачињене од трансмембранског домена (membrane spanning domains; MSD1, MSD2) који формира пору у мембрани и цитоплазматског нуклеотид везујућег домена (nucleotide binding domains; NBD1, NBD2) (154). Сваки MSD је сачињен од 6 хеликса, и то MSD1 од ТМ1-ТМ6, а MSD2 од ТМ7-ТМ12 (160). Структурално је сваки MSD праћен једним NBD-ем. Први NBD је повезан са другим трансмембранским доменом путем R домена који је јединствена карактеристика CFTR, и који није заступљен код других (158). Интраћелијски домени (NBD1, NBD2) су одговорни за тзв. АТФ-зависно отварање и затварање CFTR-а, а R домен за регулацију канала протеин-киназом А (PKA) (154). Притом, R домен у свом саставу има више потенцијалних места за фосфорилацију (12 серина и 8 треонина), тако да немају сви делови R домена подједнаку улогу у регулацији канала (160); показано је да посебно 4 места (серин 660, 737, 795 и 813) имају значајнију улогу, с обзиром да се њиховом мутацијом значајно смањује активност канала (161). Пошто је за активност CFTR канала обавезна фосфорилација протеин киназом, CFTR канал се још дефинише као сАМФ-ом активирани канал (160). За комплетну активацију CFTR канала протеин киназом А је неопходна протеин киназа С (PKC) фосфорилација на мултиплим местима (162, 163).

Отварање и затварање канала (тзв. "gating") зависи од интрацелуларне концентрације АТФ-а, а много мање од мембранског потенцијала (164).

Укратко, функционисање CFTR протеина се може објаснити протеин-киназа зависном фосфорилацијом R домена која доводи до конформационих промена R домена, што фаворизује везивање АТФ-а за NBD-е (165-167), након чега долази до стварања NBD1-NBD2 хетеродимера (168, 169). По стварању поменутог димера, интрацелуларне петље (ICL1-ICL4) које полазе са MSD-а ступају у интеракцију са NBD димером и променом своје позиције доводе до конформационих промена MSD-а и отварања канала (170, 171). Хидролиза АТФ и његово одсуство доводи до дисоцијације овог димера и затварања канала (168, 172).

Код већине ABC протеина се енергија добијена везивањем и хидролизом АТФ на NBD користи за пренос различитих супстрата кроз мембрану, за разлику од CFTR-а, који на јединствен начин функционише као јонски канал зависан од АТФ (160). Дакле, CFTR, за разлику од других ABC транспортера, функционише пре као анјонски канал за транспорт Cl^- и HCO_3^- преко апикалне мембране епителне ћелије, него као транспортер (173). Притом је пропустљивост за хлориде пет пута већа него за бикарбонате (156).

Укратко, велики део секретованих бикарбоната у панкреасу се преузима из екстрацелуларног простора преко базолатералне мембране епителне ћелије путем $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортера. Остали део бикарбоната долази од конверзије CO_2 у HCO_3^- и H^+ (реакција катализована угљеном анхидразом).

Тако нагомилани бикарбонати у ћелији се секретују преко апикалне мембране епителних ћелија панкреасног дукталног система. Веома мала количина течности богата хлоридима се секретује од стране ацинусних ћелија. У проксималном дукталном систему панкреаса (у близини ацинусних ћелија) секреција HCO_3^- се одвија преко SLC26A6 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ транспортера. Услед секреције HCO_3^- и апсорпције Cl^- , концентрација Cl^- опада, а HCO_3^- расте како панкреасни сок пролази кроз дуктални систем. У дисталним дуктусима где је концентрација HCO_3^- висока, секреција HCO_3^- се одвија преко CFTR протеина (174, 175).

Када се CFTR канал отвори, анјони се крећу дуж електрохемијског градијента и максимална концентрација HCO_3^- која се може постићи у лумену панкреасног канала је 140-150 mM (175). CFTR протеин се иначе налази на апикалној мембрани секреторних

епителних ћелија (176), па тако, осим у панкреасу, може се наћи и у епителним ћелијама дисајних путева, црева, билијарног стабла, мушког репродуктивног тракта (vas deferens), плјувачним и знојним жлездама (156). CFTR протеин се може наћи и у неепителним ћелијама, тј. у ћелијама глатког мишића (177, 178), миоцитима срчаног мишића (179, 180), макрофагима (181) и еритроцитима (182, 183).

У егзокрином панкреасу CFTR протеин транспортује бикарбонате из епителне ћелије панкреасног канала у лумен канала, а бикарбонати осмотским путем за собом повлаче воду и тако повећавају волумен панкреасног сока. На тај начин поменути епителна ћелија панкреаса секретује алкални панкреасни сок богат бикарбонатима, који испира проензиме панкреаса кроз канал у дуоденум и тако спречава њихову активацију у самом панкреасу. Наравно, што је већи волумен панкреасног сока тј. већа секреција бикарбоната, то ће и проток панкреасног сока бити већи и проензими се неће задржавати у каналима панкреаса (174, 184, 185). Када је функција CFTR смањена или недостаје, волумен излученог панкреасног сока ће бити редукован, а вискозитет повећан; панкреасни канал ће бити склонији опструкцији, те ће се задржани проензими у панкреасном каналу превремено активирати и проузроковати дигестију панкреаса тј. настанак панкреатитиса (174, 185). Уз то, с обзиром да је CFTR одговоран за секрецију бикарбоната, има кључну улогу у смањењу киселости тј. вредности рН излученог панкреасног сока. Студије показују да би повећана екстрацелуларна киселост могла довести до настанка и повећања тежине акутног панкреатитиса кроз превремену активацију зимогена (186). У току нормалне секреције панкреаса се са зимогенима из ацинусних ћелија ослобађају и протони (H^+) (186). Смањена секреција бикарбоната у лумен канала смањењем функције CFTR канала, па самим тиме и смањеном алкализацијом, може генерисати развој панкреатитиса, а пошто губитак интегритета тесних интерћелијских веза омогућава пролазак панкреасних ензима у интерстицијум (185). Такође, смањена вредност рН у лумену панкреасног канала је удружена са аутоактивацијом трипсиногена у трипсин, а онда и аутодигестијом панкреаса (185). Присуство активног трипсина у лумену панкреасног канала додатно доводи до смањења секреције бикарбоната у лумен канала инхибицијом CFTR-а и других анјон транспортера (нпр. SLC26) преко протеиназом-активираниог рецептора 2 (proteinase-activated receptor 2, PAR-2) (187).

CFTR протеин је кодиран геном који се налази на дугом краку хромозома 7 (q31-q32). Ген је сачињен од 250 000 базних парова DNK и садржи 27 егзона (157, 158, 188). Идентификован је 1989. године (189-191).

CFTR ген је изузетно полиморфан, са више од 2000 варијација описаних до сад (www.genet.sickkids.on.ca/cftr) (185, 192, 193). Неке од њих могу изазвати промену структуре, функције или експресије протеина, а тиме и довести до различитих болести ткива у којима се налази CFTR протеин. За многе од варијација *CFTR* гена ефекат на експресију гена и функцију CFTR протеина и дан данас није познат.

Према молекуларном дефекту и фенотипским консеквенцама, *CFTR* варијације су оригинално класификоване у 5 класа и то је тзв. традиционални 5-класни систем (194). За класе I-III се сматра да дају тешке, а класе IV-V су удружене са блажим фенотипским консеквенцама. Студије су показале значајну корелацију класа I-III са инсуфицијенцијом егзокриног панкреаса (pancreatic insufficiency, PI), тј. са обољењем код кога панкреас не може сам да вари храну, већ је потребна суплементација ензимима паннкреаса (195, 196). Класе IV-V су удружене са фенотипом суфицијентног панкреаса (pancreatic sufficiency, PS), тј. панкреаса који има довољно резерве егзокриног панкреаса да сам вари храну, без потребе за суплементацијом панкреасних ензима (195, 196). Показано је да су пацијенти са генотипом удруженим са благим фенотипским манифестацијама (PS) у већем ризику за развој панкреатитиса, у односу на генотип који доводи до умерено-тешких промена фенотипа (PI). То се објашњава тиме да се на терену инсуфицијентног панкреаса тј. недостатка ацинуса панкреаса који су неопходни за развој панкреатитиса, симптоматски панкреатитис не може ни развити, или се ретко развија (197). Касније је предложена и VI класа мутација, и оне су у вези са појавом тешких функционалних и фенотипских консеквенци (157, 185).

CFTR ген кодира CFTR протеин, који се из Голџијевог апарата транспортује до ћелијске мембране где испољава своју функцију. На путу стварања функционалног CFTR протеина може доћи до различитих грешака, које ће за последицу имати недостатак или смањену функцију протеина. *CFTR* варијације различитим механизмима утичу на функцију CFTR протеина, доводећи до дефектне синтезе протеина (смањена или недостаје), поремећаја обраде и преноса новоформираног протеина до ћелијске мембране,

поремећаја регулације протеина, поремећаја спровођења јона и нестабилности протеина (198).

Табела 2. Приказ механизма дисфункције CFTR протеина према класама варијација

I класа	Изазива најтеже последице. Узрокује комплетан недостатак CFTR протеина, јер се исти не синтетише (157, 158, 198).
II класа	Ствара се незрео CFTR протеин који се на путу ка ћелијској мембрани у највећој мери деградира (157, 158, 198).
III класа	Ствара довољне количине протеина у ћелијској мембрани, али постоји поремећај активације и регулације (тзв. „gating“) канала, па канал не функционише, тј. не одговара на стимулацију cAMP и ATP (157, 158, 198).
IV класа	Резултује присутним CFTR протеином у ћелијској мембрани који реагује на стимулусе, али генерише смањен проток Cl ⁻ (157, 158, 198).
V класа	Резултује парцијално дефектном синтезом и обрадом CFTR протеина (157, 158, 198), па према томе смањеном количином функционалног протеина (193).
VI класа	Одликује се смањеном стабилношћу CFTR протеина или смањеним спровођењем јона (осим Cl ⁻) (157, 158, 198).

Овакав приступ класификационог система пружа увид у различите механизме дисфункције CFTR протеина. На тај начин је могуће разматрати и циљану терапију пацијената носилаца поменутих варијација.

Тако, на пример, они из I класе би се можда могли лечити заменом гена тј. техникама генске терапије (198), супресијом стоп кодона увођењем аминокликозида у терапију (која опет временски мора бити ограничена због нефротоксичности и ототоксичности) (199), као и коришћењем аталурена (PТС 124) (200, 201). Терапија за варијације из II класе би захтевала фармаколошке методе за повећање нивоа функционалног протеина на ћелијској мембрани супресијом деградационог процеса протеина. Овде бисмо „коректорима“ означили једињења која повећавају ниво протеина

на ћелијској мембрани (158). Такви су нпр. VX-809 (158), инхибитори типа 5 фосфодиестеразе (PDE5) (силденафил) (202), натријум-4-фенилбутират (4-PBA) (203).

Терапија код III и IV класе би захтевала повећану активацију функционалног протеина на ћелијској мембрани уз потенцирање бољег „gatinga“ CFTR канала; таква једињења се називају „потенцијатори“ (158), као што су нпр. VX-770 (204, 205), NS004 (206), генистеин (206), флоксин (207), Gract-11 (208).

Терапија код V и VI класе подразумева повећање iRNK и повећање активности CFTR протеина. Корисним би се могли показати 4-PBA (203, 209, 210), милринон или генистеин (206, 211).

Овакав традиционални класификациони систем се одликује недостацима (212). Прво, молекуларне промене различитих варијација унутар исте класе (а нарочито важи за IV и V класу) могу имати варијабилне функционалне консеквенце. Друго, варијације могу имати преклапајуће молекуларне дефекте који се могу приписати више од једној класи. Треће, молекуларне консеквенце ретких CFTR варијација су непознате или се не могу предвидети.

Да би се превазишли недостаци традиционалне класификације CFTR варијација у 6 класа и да би се омогућила процена ризика настанка панкреатитиса код носилаца CFTR варијација, креиран је нови скор систем, тзв. Pancreatic Insufficiency Prevalence scoring system (PIP скор), који на основу функционалне тежине разврстава варијације у лаке тј. благе (<0,25) и тешке (>0,25) (197). Нови класификациони PIP скор је заснован на: 1) добро постављеној корелацији између тежине CFTR варијације и функције егзокриног панкреаса; 2) додељивању доминантног фенотипског ефекта блажој од две варијације (због веће панкреасне ацинусне резерве) и 3) доступности базе података са великим бројем пацијената са цистичном фиброзом и строго дефинисаним постављеним дијагнозама и одређеним статусом егзокриног панкреаса (185).

PIP скор за одређену CFTR варијацију се израчунава на основу односа броја пацијената са PI који су носиоци те варијације и свих пацијената (PI и PS) носилаца исте варијације (хомозигота или хетерозигота) у комбинацији са варијацијама за које се зна да дају тешке консеквенце (185).

Због очуване ацинусне резерве, пацијенти који према PIP скору носе благу *CFTR* варијацију, имају 71% већу шансу да развију симптоматски панкреатитис од оних који су носиоци тешке варијације (197).

Поред осталих, често испитиване варијације *CFTR* гена су полиморфизми појединачних нуклеотида (SNPs): 350G>A (rs78655421, R117H), 1408G>A (rs213950, M470V), и IVS8 poly-T (rs1805177, 5T/7T/9T алел).

R117H (Arg117His) варијација подразумева промену гуанина аденином (350G>A) у егзону 4 *CFTR* гена, што последично доводи до замене аргинина хистидином у позицији 117 тј. у првој екстрацелуларној вијузи (ECL1) између првог и другог сегмента трансмембранског домена *CFTR* протеина (213-216). Sheppard је са својим сарадницима 1993. године први показао да R117H изазива смањену спроводљивост *CFTR* канала, и то смањењем количине канала, њихове спроводљивости и просечног времена за које су отворени (213, 216). У истом истраживању је показано да је, у присуству варијантног *CFTR* алела, у поређењу са дивљим типом, вероватноћа да је канал у отвореном стању за око 70% мања (213). Дакле, R117H кодира парцијално функционалан протеин. Припада класи IV са PIP скором 0,04 (185). Међутим, постоје истраживања која указују да функционалном дефициту R117H-*CFTR* протеина доприноси много више поремећај „gatinga“ канала, а мање поремећај спроводљивости, што их наводи да R117H сврстају у III класу варијација (216). Сматрано је да је поремећај „gatinga“ канала у вези са контролом од стране NBDs-а (217), међутим показано је да у присуству R117H на контролу „gatinga“ канала доминантно утиче промена у MSD (216).

M470V полиморфизам у егзону 10 *CFTR* гена утиче на кодирање дела првог NBD-а *CFTR* протеина, па тако испољава утицај на функцију поменутог протеина (218-220). M470 алел у односу на V470 омогућава већу функцију *CFTR* канала повећаним бројем канала, већом вероватноћом да канал буде отворен или комбинацијом оба (218). Показано је да M470 алел узрокује успорену матурацију *CFTR* протеина, али повећава вероватноћу за скоро 2 пута да *CFTR* канал буде отворен, те тако утиче на отварање и затварање канала (218). Иста студија је утврдила да је активност M470 *CFTR* канала у транспорту јона 1,7 пута већа у односу на V470 *CFTR* протеин, те да успорена матурација до које доводи M470 алел нема компензаторни ефекат (218). Без обзира на разлику у функцији *CFTR* протеина до које може довести M470V полиморфизам, до сада нема извештаја који би

могли директно довести у везу одређена клиничка стања са М470V полиморфизмом, већ искључиво у комбинацији са другим полиморфизмима где би се могао испољити синергистички ефекат (221-223). У близини политиминске секвенце (IVS8 poly-T) у интрону 8 *CFTR* гена, а која испољава полиморфизам, налази се преко 120 полиморфних локуса (218, 224). Неки од тих алела су са високом учесталošћу заступљени у општој популацији, а међу њима се могу издвојити М470V и (TG)_m (225, 226). С обзиром да IVS8 poly-T варијација утиче на исецање егзона 9 *CFTR* гена током процеса транскрипције, спроведеном студијом од стране Currens et al. (218), се дошло до закључка да и други генски локуси, осим T_n, могу утицати на исецање егзона 9 током транскрипције. Чињеница је да се T5 алел може наћи и у популацији здравих, а не само оболелих од одређене болести, што указује да ову варијацију одликује парцијална пенетрантност (227). Иако се о утицају (TG)_m на пенетрантност T5 алела зна много више, тј. да већи број понављања TG омогућава знатније исецање егзона 9 у процесу транскрипције, студијом Currens et al. (218) је такође показано да, у комбинацији са (TG)_m и T_n у оквиру хаплотипа, М470V може испољити улогу у парцијалној пенетрантности T_n локуса (218).

IVS8 poly-T је једна од најчешће испитиваних *CFTR* варијација. Представља секвенцу од 5, 7 или 9 нуклеотида тимина (T) у интрону 8 *CFTR* гена, тј. на споју интрон 8 - егзон 9. У зависности од броја тимина у поменутој секвенци, може се јавити делеција егзона 9 у транскрипту *CFTR* гена (егзон 9^г транскрипти). Показано је да егзон 9 кодира 21% аминокотерминалног краја NBD1, те да је значајан за функцију *CFTR* (190). Што је број тимина мањи, тј. poly-T тракт краћи, то је вероватноћа за делецију егзона 9 већа (228). Делеција егзона 9 ће резултовати смањеном функцијом *CFTR* протеина услед недостатка 21% аминокотерминалног дела NBD1 (218, 229, 230). С обзиром на значај NBD1 у gating-у *CFTR* канала, јасно је зашто је бројним студијама је показано да је *CFTR* протеин ефикаснији што је poly-T секвенца дужа (214, 227, 228, 231, 232).

На споју интрон 8 - егзон 9 је идентификовано и понављање динуклеотида TG, и то 10-12 понављања (198). То понављање динуклеотида TG директно утиче на транскрипцију егзона 9 независно од T_n локуса по студији коју су извели Currens et al. (218), и то тако да већи број понављања TG омогућава знатније исецање егзона 9. Тако је показано да у присуству T7 алела количина *CFTR* транскрипата којима недостаје егзон 9 је 2,8 пута већа

код алела (TG)11 и 6 пута код алела (TG)12, у поређењу са алелом (TG)10 (218). Niksic et al. су својом студијом (233) утврдили да (TG)_m директно не утиче на ексклузију егзона 9 независно од Tn локуса, већ да он модулира транскрипцију егзона 9 када је активиран Tn локусом, и то искључиво у присуству 5T алела; и то тако да је степен делеције егзона 9 директно пропорционалан броју понављања TG парова, а обрнуто пропорционалан дужини poly T секвенце. Због утицаја других варијација у близини Tn локуса, укључујући (TG)_m, M470V и R117H, на његову пенетрантност, 5T варијација се одликује парцијалном пенетрантношћу(218). IVS8 5T има PIP skor 0,25 и припада благим мутацијама (185).

Показан је утицај IVS8 poly T алела тј. дужине политимидинског тракта у интрону 8 код индивидуа са R117H варијацијом (234), стога би их требало истовремено тестирати (214). Показано је да R117H у комбинацији са IVS8 7T формира нормалан ниво парцијално функционалног протеина, док у комбинацији са IVS8 5T формира смањен број CFTR протеина пуне дужине (198). У првом случају доводи до блаже форме цистичне фиброзе, а у другом до тешке форме.

1.8.2. Полиморфизам гена за факторе некрозе тумора

Фактори некрозе тумора спадају у цитокине, тј. мале протеине које секретују ћелије у стресу или током оштећења, а притом имају улогу у интеракцији и комуникацији ћелија (66, 235). У нивоу стварања фактора некрозе тумора постоје интериндивидуалне разлике (236), при чему до 60% варијабилности у продукцији фактора некрозе тумора код различитих особа може бити генетски одређено (237). С обзиром на значај цитокина у инфламаторном одговору код акутног панкреатитиса, функционални полиморфизми кодирајућих гена могу допринети тежини и еволуцији запаљенског процеса у панкреасу (238). TNF- α и TNF- β , као проинфламаторни цитокини, имају важну улогу у локалном и системском инфламаторном одговору како у почетном стадијуму акутног панкреатитиса, тако и у развоју тешке форме (239). Они представљају потентне медијаторе имуног одговора и имају улогу у стимулацији стварања других цитокина, као што су интерлеукини 6 и 8 (IL-6, IL-8), такође значајни у инфламаторном одговору (240, 241).

1.8.2.1. Полиморфизам гена за фактор некрозе тумора α (TNF- α)

TNF- α („кахектин“, енгл. cachectin) је проинфламаторни цитокин кога стварају макрофаги, мастоцити, NK ћелије и сензитивни неурони (235). Прво истраживање које се односи на фактор некрозе тумора је спроведено 1975. године од стране Carswell et al. (242) када су пронашли да у серуму миша инфицираног бацилом Calmette--Guerin (BCG) постоји супстанца (TNF- α) која својим цитотоксичним ефектом доводи до хеморагијске некрозе тумора као ендотоксин, па је тако и добио име. Иначе је идентичан молекулу кахектина који се доводи у везу са кахексијом (243). Има бројне биолошке улоге (ћелијска диференцијација, пролиферација, апоптоза, бројни одговори на стрес и повреду, итд.), а доводи се у везу са започињањем септичног шока (243). Од свих цитокина (монокина) које стварају и којима утичу на имуни одговор, макрофаги у највећој количини стварају TNF- α (244). То је негликозилирани протеин, ствара се у форми пропептида који у свом саставу има 233 аминокиселине, али је улога овог пропептида још увек нејасна (244, 245). Првих 76 аминокиселина чини сигнални пептид, чијим одвајањем настаје зрела форма TNF- α који у свом пептидном ланцу има 157 аминокиселина (244, 245) и укупне је масе 17,3 kDa (245). Макрофаги не производе TNF- α под нормалним условима и нема га у виду депоа, већ се њихова синтеза одвија *de novo*, након што се моноцити активирају одређеним стимулусима (244). Ова биосинтеза TNF- α је регулисана на више нивоа (244, 246-249), мада се чини да је главна контрола продукције на посттранскрипционом нивоу (250).

Своје ефекте TNF- α остварује везивањем за плазма мембранске рецепторе. Ови рецептори су протеини молекулске тежине око 300 kDa (251), и састављени су од различитих субјединица (252), при чему везујућа субјединица рецептора има молекулску тежину од приближно 75 kDa (252-255). Након интеракције TNF- α са рецептором, започињу биолошки ефекти који код неких ћелија доводе до инхибиције раста и ћелијске смрти (вероватно само код туморских), а код других, као што су фибробласти, до стимулације раста (вероватно као физиолошка улога TNF- α код нормалних ћелија) (256, 257). У суштини, најчешћи ефекти који се доводе у везу са TNF- α су катаболички и инфламаторни (244). Пошто му се рецептори налазе на многим местима у организму, ефекти TNF- α уочени су и испитани на бројним ткивима (256, 258).

TNF- α доводи до хеморагијске некрозе одређених тумора различитим ефектима на васкуларни ендотел, промовишући стање шока (244). Уз то, у патогенези ендотоксичног шока као главни медијатор утиче на адхезију за ендотел и активацију неутрофила (244, 259, 260-263). Тиме доводи до маргинације неутрофила и изласка из интраваскуларног простора и оштећења ткива (244). Уз све ово, TNF- α појачава активност неутрофила у борби против инфективних агенаса (264), стимулише фагоцитозу (262), појачава експресију комплементарних рецептора на неутрофилима и тако доприноси присуству неутрофила на месту запаљења у борби против инфекције (265). Поменути хемотаксички ефекат TNF- α има и на моноците, па регрутујући фагоцитне ћелије из васкуларног компартмана и активирајући их, помаже у борби против различитих штетних агенаса (266, 267). Директним ефектом на Т лимфоците појачава имуни одговор (268), а такође испољава цитотоксичност усмерену према лимфоцитима (269, 270). Тако својим утицајем на функционисање В и Т лимфоцита, може довести до прогресије хематопоезних малигнитета (271).

Ефекат TNF- α на адипоците (272, 273) оправдава стари назив „кахектин“, јер својим утицајем на метаболизам масних ћелија ослобађа енергију неопходну за имуни одговор код акутних болести (244). Свој утицај на мишићне ћелије остварује као медијатор, индиректним ефектом кроз катаболизам протеина (274, 275), али и кроз смањење трансмембранског потенцијала мишићних ћелија у стању шока (244, 276). Што се тиче утицаја на јетру, TNF- α је хепатотоксичан (277). Он је укључен у акутној фази имуног одговора организма на различите токсичне агенсе, па тако доводи до смањене синтезе албумина и повећане синтезе фибриногена (278), притом је укупна синтеза протеина у јетри супримирана кахектином (279).

У гастроинтестиналном тракту се концентрише 10% од укупног TNF- α који се системски примени (258), притом изазива некрозу у регији цекума (280, 281). Уз то, успорава пражњење желуца и доприноси лошијем функционисању гастроинтестиналног тракта (281). С обзиром да се TNF- α може стварати у централном нервном систему (282, 283) и да пролази хематоенцефалну баријеру (258), овај протеин изазива пирогени одговор (275, 284) директним дејством на хипоталамус или ослобађањем IL-1 (244). Када је кожа у питању, показано је да се 30% интравенски датог TNF- α накупља у кожи (258), и да TNF- α , као и TNF- β , индукују инфламацију у кожи (285, 286).

Значај TNF- α се огледа и у патогенези ендотоксичног шока (287, 288). У експерименталним условима, код пацова и паса могуће је убризгавањем TNF- α довести до хипотензије, тахипнеје, метаболичке ацидозе, хемоконцентрације и мултиплог органског оштећења (280, 289, 290).

Своју главну улогу TNF- α остварује у инфламацији, изазивању бола и ћелијској смрти (235). Утврђено је да је он врло моћан имуномодулатор и први медијатор имуног одговора, а да остварује своју улогу код многих запаљенских, инфективних и имуних болести (244). То је протеин који доводи до оштећења туморских ћелија показујући цитотоксичну и цитостатичку активност, без ефекта на нормалне ћелије (245). До његове експресије доводе бактеријски липополисахариди, митогени и вируси, а продукција је регулисана процесом транскрипције и посттранскрипционо (250, 291-295).

Акутни панкреатитис се у почетку јавља као интерстицијумски едематозни панкреатитис, који се у даљем току болести може компликовати локалним и системским компликацијама, па се тако могу разликовати лака и тешка форма болести. Механизми који доводе до тога да болест прогредира у тешку форму су мање познати. Ипак, зна се да највећу улогу у томе имају цитокини и оксидативни стрес, као главне компоненте патофизиолошких механизма системског инфламаторног одговора (67, 296). Оксидативни стрес се дефинише као поремећај баланса про-оксиданата и антиоксиданата у корист првих (297). Оксидативни стрес и проинфламаторни цитокини (попут TNF- α) су окидачи за заједнички сигнални пут који води у амплификацију неконтролисане инфламаторне каскаде, углавном кроз активацију NF- κ B и протеин киназа које се активирају митогенима (енгл. mitogen-activated protein kinases, MAPK) (67). Истраживања на тему цитокина почињу 1998. године када је Rinderknecht са својим сарадницима предложио хипотезу да се ефекти на удаљеним органима јављају након оштећења панкреаса и последичног отпуштања инфламаторних медијатора од стране активираних имуних ћелија (298). Уствари, мултиорганско оштећење се јавља код акутног панкреатитиса слично као код трауме, опекотина, сепсе итд, где нема ослобађања панкреасних ензима (67). У свему овоме активирани леукоцити имају кључну улогу у претварању локалног запаљења у системско (299, 300). Нормална функција леукоцита, а пре свега неутрофила, јесте фагоцитоза и уклањање токсичних агенаса на месту локалног запаљења (298). У раној фази инфламације панкреаса доминирају неутрофили, који након

дигестије фагоцитованог материјала, због кратког полуживота, доживљавају ћелијску смрт (298). У каснијој фази, циркулацијом на место оштећења панкреаса стижу моноцити који буду активирани у макрофаге, и они ту остају дуже (298). Макрофаги, као и неутрофили, имају хидролитичке ензиме. Они секретују проинфламаторне медијаторе (IL-1, IL-6, TNF- α), као и различите друге супстанце, између осталог протеазе, ткивни фактор који доводи до стварања тромба, фактор активације тромбоцита (енгл. platelet activating factor, PAF) итд. (298, 299). Када је количина материјала (мртве ћелије, бактерије итд.) толико велика да се јавља енормна активација неутрофила и макрофага, па они неконтролисано секретују велике количине поменутих супстанци и кисеоничких слободних радикала у екстрацелуларни простор, тада се јавља додатно оштећење здравог ткива, што појачава инфламацију и отвара зачарани круг који локално запаљење претвара у системско (298). Важно је поменути да је од свих ензима које луче неутрофили, најдеструктивнији еластаза, која оштећује крвне судове доводећи до лезије еластичног слоја малих крвних судова, што доводи до хеморагије и тромбозе (298). Када је у питању значај панкреасних ензима трипсина и фосфолипазе A₂ у доприносу системским компликацијама, они изазивају редом дисеминовану интраваскуларну коагулацију (енгл. disseminated intravascular coagulation, DIC) (301) и оштећење ендотела плућа (302).

Резимирано, активирани леукоцити су главни извор цитокина на почетку акутног панкреатитиса, а потом су то макрофаги, који су одговорни за амплификавање инфламаторне каскаде, с обзиром да када се једном створи неки цитокин, он индукује своју експресију, али и експресију других цитокина (66). То је случај са интерлеукином-1 β (IL-1 β) и TNF- α , пошто они започињу и пропагирају системски инфламаторни одговор (енгл. systemic inflammatory response syndrome, SIRS) (66, 67, 303). TNF- α доприноси SIRS-у изазивањем повишене телесне температуре (284), поспаности, стања шока (304), леукопеније, индукцијом синтезе простагландина и колагеназе (286), инхибицијом липопротеинске липазе (305) и повећаном синтезом протеина акутне фазе у јетри (278). О значају TNF- α у SIRS-у говоре студије изведене на животињама у стању шока, а које показују да се специфичном инхибицијом активности TNF- α смањује морталитет (305, 306).

Неколико студија је показало да код пацијената са SIRS-ом постоји позитивна корелација пораста нивоа циркулишућег TNF- α са тежином болести (303). Заправо, TNF- α

доводи до вазодилатације, повећава микроваскуларну пермеабилност, активира леукоците, индукује ослобађање других цитокина и експресију ћелијских адхезивних молекула, па тако пропагира инфламаторну каскаду (67). Показано је да са почетком акутног панкреатитиса долази до повећане експресије гена који кодира TNF- α и повећања количине TNF- α (307) у панкреасу више него у серуму, али и да пораст нивоа TNF- α у ткиву и серуму корелира директно са тежином акутног панкреатитиса (308). Осим тога, продукција TNF- α је повезана и са експресијом гена који кодира рецепторе за TNF- α (66). Ови солубилни рецептори за TNF- α (TNF- α R-I, TNF- α R-II или другачије названи sTNFR55 и sTNFR75) се продукују и отпуштају у циркулацију у раном стадијуму болести истовремено са порастом нивоа TNF- α у серуму (309, 310). TNF- α је у серуму углавном везан за специфичне протеине, а пораст концентрације TNF- α R-I сугерише да би они могли бити протеини за које се везује TNF- α (310). Ако бисмо пратили степен продукције TNF- α током инфламације, онда бисмо мерили не само слободан TNF- α у серуму, већ укупни (слободан + везани за TNF- α R-I) (311). Концентрација солубилних TNF- α рецептора у серуму корелира са тежином клиничке слике акутног панкреатитиса, с обзиром да је она већа код пацијената са мултиплом органском инсуфицијенцијом (312). TNF- α се ствара у различитим ткивима у току акутног панкреатитиса, прво у панкреасу, а неколико сати након пораста нивоа TNF- α у панкреасу, и у осталим органима који у току болести могу развити органску дисфункцију (308, 313), а најчешће у плућима, јетри и слезини (313, 314). Међутим, главни извор у почетку су леукоцити у запаљенском инфилтрату ткива панкреаса (66). Треба рећи да су количине TNF- α у ткиву панкреаса неколико пута веће у односу на ниво TNF- α у серуму, па да су тако велике количине токсичне за ћелије панкреаса (66). Овако велику продукцију TNF- α у панкреасу, а понајвише су за то касније одговорни макрофаги, потврђује чињеница до које су дошли Grewal et al., да се неколико пута већа концентрација TNF- α налази у портној вени, него у системској циркулацији (307). Истом студијом (307) се дошло до закључка да је мања концентрација TNF- α у серуму узетом из хепатичних вена и феморалне артерије, него из портне вене, што указује на деградацију TNF- α у јетри; па би јетра могла бити орган који штити организам у току акутног панкреатитиса од мултипле органске инсуфицијенције. Велика концентрација TNF- α у панкреасу током акутног панкреатитиса доводи до апоптозе ацинусних ћелија (66), и тако утиче на тежину болести. Ово доказују и

експерименталне студије на животињама са акутним панкреатитисом лишеним TNF- α рецептора, где је уочена редукција апоптозе ацинусних ћелија (313, 315). О значају TNF- α за SIRS код акутног панкреатитиса, говори студија у којој је код нокаут мишева лишених TNF- α рецептора смртност смањена код акутног некротизујућег панкреатитиса због умањеног системског имуног одговора, али без утицаја на тежину панкреатитиса (316). Исто тако, показано је да је концентрација TNF- α (али и IL-6 и IL-8) већа код пацијената са акутним панкреатитисом који имају системске компликације у односу на оне који их немају, што сугерише на значај који ови проинфламаторни медијатори имају, не само у сепси, већ и у патофизиолошким процесима у акутном панкреатитису (317). Слично је показано студијом која је испитивала утицај TNF- α на патофизиолошке процесе код акутног панкреатитиса, а утврдила је да степен инфламације индукован са TNF- α корелира са тежином акутног панкреатитиса (309). Као један од фактора ризика за повишен морталитет код пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса се наводи гојазност (318). Иначе, гојазност се доводи у везу са повећаном концентрацијом TNF- α у серуму и ткивима (319).

Као проинфламаторни цитокин, TNF- α игра важну улогу на почетку развоја панкреатитиса, што потврђују студије које су доказале повећану експресију TNF- α у панкреасу већ на самом почетку експериментално изазваног панкреатитиса (308, 320, 321). Као један од првих цитокина који започиње запаљенску каскаду (65) и амплификује инфламаторни одговор (66), TNF- α утиче на локални и системски инфламаторни одговор организма, па на тај начин утиче на тежину и еволуцију инфламаторног одговора (238). Значај TNF- α у инфламаторном одговору показује ефекат антагониста TNF- α који доводе до смањења локалног запаљења панкреаса (320, 322), али и смањења морталитета код тешке системске болести услед експериментално изазваног акутног панкреатитиса (323). Показано је, такође, да блокадом фактора некрозе тумора долази до смањења продукције проинфламаторних цитокина, па самим тим и тежине панкреатитиса, што доводи до бољег преживљавања и смањења смртности, а с друге стране указује на функцију TNF- α као амплификујућег фактора инфламације који повећава експресију осталих цитокина (323).

Утврђено је да развоју мултипле органске инсуфицијенције и тешкој форми акутног панкреатитиса претходи пораст серумских концентрација TNF- α (324). На експресију TNF- α највише утичу полиморфизми *TNF- α* гена који кодира TNF- α (325), али

је показано и да *TNF-β* ген са својим полиморфизмом *TNF-β* 252G>A може утицати на ниво секретованог *TNF-α* (326, 327). Према томе, полиморфизми *TNF-α* гена могу имати утицаја на ток и исход тешке форме настале болести (328).

Ген који кодира *TNF-α* се налази унутар III класе региона главног хистокомпатибилног комплекса (енгл. Major Histocompatibility Complex, MHC) на хромозому 21.3 (329). Хумани MHC се налази на кратком краку 6. хромозома, између p21.1 и p21.3 (329). *TNF-α* ген је дужине 1585 bp (245), и ради се о региону који је веома полиморфан (330). Показано је да 2 највише проучавана полиморфизма у региону промотера *TNF-α* гена могу утицати на стварање *TNF-α* (325, 331), уједно се сматрају најзначајнијим полиморфизмима и најчешће довођеним у везу са настанком панкреатитиса (332). Wilson et al. су открили значај полиморфизма *TNF-α* -308G>A (331, 333), а другом студијом коју су спровели D'Alfonso et al., показан је значај *TNF-α* -238G>A(325).

TNF-α -308G>A полиморфизам дефинише две варијације променом гуанина у аденин на позицији -308, и то чешћи облик *TNF-α*-308G и варијантни облик *TNF-α* -308A (331). Мање заступљени полиморфизам *TNF-α*-308A директно регулише *TNF-α* ген и повећава транскрипцију, па је тако удружен са фенотипом где је повећана продукција *TNF-α* (334). Познато је да је полиморфизам *TNF-α*-308A директан и два пута снажнији активатор транскрипције него што је то *TNF-α*-308G (334, 335), резултујући повишеним нивоом *TNF-α* (53). Мада, постоји студија која не дели овај став и чији је закључак да је степен транскрипције и продукције *TNF-α* подједнак у случају дивљег и варијантног типа алела (336). Ипак, полиморфизам *TNF-α*-308A се доводи у везу са тежим обликом инфективних болести маларије (337), мукокутане лајшманијазе (338), менингококне болести (339), али и септичним шоком (340).

TNF-α -238G>A полиморфизам променом гуанина у аденин на позицији -238 даје две варијације: дивљи тип алела *TNF-α* -238G и варијантни тип алела *TNF-α* -238A (325, 332). Као и промена гуанина у аденин у позицији -308, исто тако и у овом случају замена гуанина аденином узрокује већи степен транскрипције *TNF-α* гена, што доводи до веће продукције *TNF-α* протеина (341). Варијантни тип *TNF-α* -238A алел је удружен са наследним обликом хроничног панкреатитиса у породицама са присутним *PRSSI* варијацијама (R122H, N29I) (342).

1.8.2.2. Полиморфизам гена за фактор некрозе тумора β (TNF- β)

TNF- β (лимфотооксин алфа, енгл. lymphotoxin-alpha) је један од првих откривених лимфокина (343). Стварају га Th₁ и Tc ћелије, а потом се овај гликопротеин укључује у сазревање, активацију и пролиферацију В лимфоцита (235, 344, 345). Главну улогу TNF- β остварује у процесу фагоцитозе, стварању NO и смрти ћелије (235), али и у диференцијацији ћелија, стимулацији раста, у имунорегулацији, борби против инфективних узročника; притом у борби против бактерија много мање од TNF- α , али више против паразитних узročника и вируса (343). TNF- β може довести до деструкције ткива и учествовати у патогенетском механизму различитих болести, као и TNF- α , па их је у таквим случајевима врло тешко разликовати (343). И док TNF- α стварају активирани моноцити, TNF- β стварају активирани лимфоцити, па зато припадају цитокинима кој се називају лимфокини (346). Међутим, лимфоцити у зависности од стимулуса могу продуковати и TNF- α (347). Уз то, нема публикација које показују и обрнуто, да макрофаги могу продуковати TNF- β (244). Разликује им се и индукциона кинетика; Т лимфоцити секретују TNF- β након 24-48 сати након индукције, а макрофаги секретују TNF- α 4-24 сата након индукције (348, 349). Притом продукција TNF- α доминира у првих 48 сати, а након тога доминацију преузима TNF- β (348). Сличност у саставу аминокиселина TNF- β са TNF- α постоји у око 30% (350-352). Упркос ограниченој хомологији у секвенци аминокиселина са TNF- α , TNF- β остварује *in vitro* и *in vivo* бројне биолошке активности као и TNF- α (244). То се објашњава ћелијским рецепторима који су заједнички за оба фактора некрозе тумора (346), а уз то TNF- α и TNF- β имају исти цитотоксични ефекат на бројне туморске ћелије, и испољавају синергизам са интерфероном- γ који повећава 2 до 3 пута број ћелијских рецептора за TNF (346). TNF- β изазива цитотоксичност усмерену према лимфоцитима (269, 270), као и TNF- α (353). Такође, исто као и TNF- α , директним ефектом на Т лимфоците појачава имуни одговор Т лимфоцита на антигене стимулусе (268).

TNF- β је гликозилирани мономерни протеин који у зрелој форми у свом саставу има 171 аминокиселину тј. 14 аминокиселина више од TNF- α , па је и веће молекулске масе од TNF- α , и износи 25 kDa (343, 354). Иначе, TNF- β се ствара као пропептид са 205 аминокиселина, од кога настаје зрела форма одвајањем 34 аминокиселине које чине

сигнални пептид (352). Главна контрола продукције TNF- β је на транскрипционом нивоу (355). Поред TNF- α , TNF- β има улогу потентног медијатора имуног одговора код акутног запаљења панкреаса, па заједно стимулишу продукцију осталих проинфламаторних цитокина као што су IL-6 и IL-8, и тако амплификују имуни одговор (356).

У близини *TNF- α* гена, на отприлике 1100 bp удаљености (244), такође у III класи региона MHC на кратком краку хромозома 6, се налази *TNF- β* ген који кодира TNF- β протеин (329, 352, 357). *TNF- β* ген је дужине 2400 bp (352). Овај ген, као и ген који кодира TNF- α , има у свом саставу 4 егзона и 3 интронске секвенце (343), а само један од ова три интрона по својој позицији показује хомологију са интроном *TNF- α* гена (352). Најзначајнија хомологија ова два гена је пронађена у последњем четвртог егзону, који кодира 80% секретованог TNF- β и 89% секретованог TNF- α (352). Ова хомологија четвртог егзона код *TNF- α* и *TNF- β* гена на нуклеотидном нивоу износи 56% (352). Секвенце које кодирају сигналне пептиде се такође разликују, па је логично и да им састав аминокиселина буде различит, тако да у састав сигналног пептида TNF- β протеина улази 34 аминокиселина, а у састав сигналног пептида TNF- α 76 аминокиселина (352).

TNF- β 252G>A полиморфизам је најзначајнији, а претходно је сматрано да овај полиморфизам представља део *TNF- α* гена (326, 358-360). Сада се зна да се он налази у *TNF- β* гену на позицији 252, где долази до замене гуанина аденином у позицији 252 нуклеотидног ланца у првом интрону *TNF- β* гена, што корелира са променом аминокиселине аспарагин у позицији 26 пептидног ланца TNF- β у аминокиселину треонин, и смањеним нивоом TNF- β продукције (355). Полиморфизам *TNF- β 252G>A* утиче на експресију оба гена (*TNF- α* ген, *TNF- β* ген) у класи III региона MHC комплекса на кратком краку хромозома 6, као и на концентрације TNF- α и TNF- β протеина у плазми (355, 361).

TNF- β 252G алел (B1) је ређи и представља варијантни тип алела, а *TNF- β 252A* алел (B2) представља дивљи тип алела (355). За B1 алел се подразумева да узрокује високу продукцију TNF- β протеина, док су носиоци B2 алела стварају TNF- β протеин у мањој количини (362). Показано је да хомозиготни носиоци *TNF- β 252G* алела имају и до пет пута повећану TNF- β продукцију (355). Ипак, постоје студије које су дале опречне резултате. Abraham et al. су показали да је *TNF- β 252G* алел удружен са повећаном продукцијом TNF- α у лимфобластидним ћелијама (363). Такође, као што је напоменуто,

полиморфизам *TNF-β* 252G>A утиче на експресију *TNF-α* гена, па према томе на ниво секретованог *TNF-α*, јер је показано да хомозиготни носиоци *TNF-β* 252A алела луче веће количине *TNF-α* од хетерозиготних носилаца *TNF-β* 252G>A (326, 327, 364). И у овом случају су се појавили опречни резултати, па су тако Messer et al. показали да *TNF-β* 252G>A полиморфизам не утиче на продукцију *TNF-α* (355). На основу изнетог, може се рећи да су подаци који говоре у прилог утицаја *TNF-β* 252G>A полиморфизма на лучење *TNF-α* и *TNF-β*, контроверзни и да захтевају додатна истраживања (365).

Болести панкреаса припадају за сада групи болести најтежим за рано откривање и тешким за истраживање, како због своје ретроперитонеалне локализације која отежава физикални преглед и некоштане структуре невидљиве на стандардним радиографијама, тако и због чињенице да се биопсије не препоручују, јер могу изазвати акутни панкреатитис, крвављење, стварање фистуле, па и смртни исход. Дијагноза акутног панкреатитиса се поставља на основу критеријума ревидиране Атланта класификације (23). За процену тежине већ насталог акутног панкреатитиса се користе различити предиктивни скорови, али ни један од њих не може са високом прецизношћу одредити којим током ће се болест одвијати и какав ће исход бити (366). Тешка форма акутног панкреатитиса се обично развије врло брзо након почетка болести, што захтева да се интервенције које побољшавају исход код тешке клиничке слике спроведу рано (367). Зато је неопходно развити средство које би омогућило процену ризика за настанак тешке форме болести унапред, тј. на самом почетку. Предвиђање тока и процена тежине акутног панкреатитиса тренутно су изазов за клиничаре, а генотипизација би могла бити средство за остварење циља.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. Циљеви студије

Главни циљ ове студије је утврђивање повезаности најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen, PRSS1), инхибитор панкреасног трипсина (енгл. pancreatic secretory trypsin inhibitor, serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1), трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (енгл. cystic fibrosis conductance regulator, CFTR) и факторе некрозе тумора α (енгл. tumor necrosis factor- α , TNF- α) и β (енгл. tumor necrosis factor- β , TNF- β) са настанком компликација или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.

2.2. Хипотезе студије

Хипотезе предложене студије су следеће:

1. Варијације гена који кодира PRSS1 повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
2. Варијације гена који кодира SPINK1 повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
3. Варијације гена који кодира CFTR повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
4. Варијације гена који кодира TNF- α повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
5. Варијације гена који кодира TNF- β повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1 Врста студије

Због релативно мале стопе компликација и смртног исхода код пацијената са дијагнозом акутног панкреатитиса, као и због ограничености студије на само једно место истраживања, студија је дизајнирана као „случај-контрола“.

Студија је одобрена од стране Етичког одбора Клиничког центра Крагујевац (одлука број 01-9024 од 01.09.2011. године). У спровођењу ове студије поштовани су принципи Хелсиншке декларације о заштити права субјеката истраживања, као и принципи Добре клиничке праксе.

3.2. Популација која се истраживала

Популација из које су узети и случајеви и контроле су били пацијенти Јединице интензивног лечења, Клинике за општу и грудну хирургију и Ургентног центра Клиничког центра Крагујевац, лечени од акутног панкреатитиса. Студија је дизајнирана као ретроспективна, а укључила је 98 пацијената оболелих од акутног панкреатитиса у периоду од новембра 2011. године до маја 2014. године.

За укључивање у студију пацијенти су морали да задовоље све критеријуме за укључивање, и то: потврђена дијагноза акутног панкреатитиса и хоспитализација у Јединици интензивног лечења, на Клиници за општу и грудну хирургију или у Ургентном центру Клиничког центра Крагујевац.

Пацијенти се нису укључивали у студију уколико су задовољили макар један од критеријума за искључивање, и то: млађи од 16 година, пацијенти са постоперативним акутним панкреатитисом, труднице и пацијенти преведени из других установа у Клинички центар Крагујевац касније од 48 сати од почетка болести.

Дијагноза је постављана на основу присуства најмање два критеријума од следећа три: 1) бол у трбуху карактеристичан за акутни панкреатитис 2) серумска амилаза и/или липаза повишена најмање три пута у односу на горњу границу референтног опсега 3) карактеристичан налаз акутног панкреатитиса на компјутеризованој томографији (72).

Тежина болести је процењивана на основу клинички заснованог Атланта класификационог система из 1992. године (22), тако да је лака форма подразумевала постојање минималне органске дисфункције уз враћање нарушене функције органа и одсуство локалних компликација (некроза, псеудоциста, апсцес), а тешка форма – присуство органске инсуфицијенције и/или локалне компликације тј. некрозу, апсцес или псеудоцисту. Овај класификациони систем (22) је важио све до 2012. године, када је учињена ревизија постојећег класификационог система уз публикавање рада и приказивање научној јавности јануара 2013. године (23). Увођењу ревидиране класификације је претходило стицање нових сазнања из области патофизиологије органске инсуфицијенције и некротизујућег панкреатитиса, као и њихових исхода, затим увођење боље дијагностике, као и мишљење да су дефиниције из 1992. године збуњујуће (80). Уз то, Атланта класификационим системом није било јасно дефинисано који је то праг пораста амилазе и/или липазе који би служио постављању дијагнозе акутног панкреатитиса. Тако је једном студијом (80) утврђено да је у највећем броју истраживања коришћен праг са скоком ензима од 3 или више пута у односу на горњу границу референтног опсега, док је у другим студијама то било ≥ 2 (52, 368, 369), >4 (370-372) или >5 (373-375). Укратко, нови класификациони систем (23) је дефинисао критеријуме за постављање дијагнозе акутног панкреатитиса, разликује 2 врсте панкреатитиса (интерстицијумски едематозни и некротизујући); увео је другачију клиничку процену тежине акутног панкреатитиса са поделом на три категорије према тежини (лака, средње тешка, тешка), али је увео и нове термине за прецизан опис локалних компликација (акутна перипанкреатична течна колекција, псеудоциста панкреаса, акутна некротична колекција, ограђена некроза). Према ревидираној класификацији (23), лака форма болести подразумева одсуство органске инсуфицијенције, локалних и системских компликација (егзацербација претходно постојећег коморбидитета узрокована акутним панкреатитисом, нпр. коронарна болест, хронична опструктивна болест плућа итд.); средње тешка форма подразумева пролазну органску инсуфицијенцију (трајање <48 сати) и/или локалне и/или системске компликације у одсуству перзистентне органске инсуфицијенције (>48 сати); тешка форма се карактерише перзистентном органском инсуфицијенцијом (>48 сати), и обично присутним, али не и обавезним за класификацију, локалним и системским компликацијама. Увођење средње тешке форме је омогућило да се одређени број

пацијената, који је иницијално у прва 24 сата болести због присутне органске инсуфицијенције сврставан у категорију тешке форме, сада сврстава у средње тешку категорију на основу повољног одговора на терапију и пролазности органске инсуфицијенције, која се терапијски решава унутар 48 сати.

С обзиром да је наша студија дизајнирана и почела са спровођењем много пре објављивања ревидиране Атланта класификације, дефиниције су се односиле на класификациони систем из 1992. године.

3.3. Узорковање

Из студијске популације су као случајеви изабрани пацијенти оболели од тешке форме акутног панкреатитиса, тј. они који су, по Атланта критеријумима из 1992. године (22), имали органску инсуфицијенцију, некрозу панкреаса, апсцес панкреаса, псеудоцисту и/или смртни исход. Контроле су били пацијенти са лаким формом акутног панкреатитиса, тј. они који нису имали наведене компликације.

3.4. Варијабле мерене у студији

У овој студији су се као независне варијабле пратиле варијације гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе и факторе некрозе тумора α и β , и то: 1) *PRSSI*: 365G>A (rs77914057), 86A>T (rs111033566); 2) *SPINK1*: 101A>G (rs17107315); 3) *CFTR*: 1408G>A (rs213950), IVS8 poly-T (rs73715573/rs10229820), 350G>A (rs78655421); 4) *TNF- α* : -238G>A (rs361525), -308G>A (rs1800629); 5) *TNF- β* : 252G>A (rs909253).

Узорци крви за генотипизацију су узимани након процене подобности за укључење пацијента у студију и потписивања формулара Информисаног пристанка. Од испитаника је узимано 10ml крви у епрувету са антикоагулансом EDTA (ethylene diamine tetracetic acid). Пуна крв се чувала у прописаним условима на -20°C до извођења анализа.

Генотипизација се спроводила методом реакције ланчаног умножавања уз примену рестрикционих ензима (енгл. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) у PCR лабораторији Факултета медицинских наука у Крагујевцу, методама описаним у литератури - *PRSSI*: 365G>A(150), 86A>T(376); *SPINK1*: 101A>G(54); *CFTR*: 1408G>A(377), IVS8 poly-T(214), 350G>A(214); *TNF- α* : -238G>A(332), -308G>A(332); *TNF- β* : 252G>A (53).

Као независне варијабле су се пратили и остали фактори који могу утицати на ток акутног панкреатитиса, и то: 1) старост пацијента (увидом у историју болести); 2) пол пацијента (увидом у историју болести); 3) етиологија (анкетирањем пацијента и увидом у историју болести) 4) коморбидитет, тј. врста акутне или хроничне болести која прати панкреатитис (утврђује се анкетирањем пацијента и увидом у историју болести); 5) пушење (анкетирањем пацијента); 6) уношење алкохола - врста, количина и учесталост (анкетирањем пацијента), 7) примена нестероидних антиинфламаторних лекова (NSAIL) (утврђује се анкетирањем пацијента и увидом у историју болести).

Као зависне варијабле пратили су се показатељи тока и исхода акутног панкреатитиса, и то: 1) некроза панкреаса (СТ прегледом са контрастом); 2) апсцес панкреаса (аспирацијом места некрозе танком иглом или присуством мехурића гаса на СТ прегледу); 3) псеудоциста панкреаса (СТ прегледом); 4) органска инсуфицијенција (увидом у историју болести); 5) смртни исход (утврђује се на основу потврде о смрти из историје болести).

3.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка процењена је на основу публикације Zhang et al. (53) о утицају варијација гена који кодира фактор некрозе тумора α са развојем тешког акутног панкреатитиса и последичног септичног шока. Ова студија је на узорку од 102 болесника са акутним панкреатитисом показала да је генотип *TNF- α* који укључује полиморфизам на позицији -308 заступљенији код оних код којих се развио септични шок у односу на болеснике без септичног шока (53,1% наспрам 20%). Употребом статистичког програма

G*Power за Фишеров тест, уз прихваћене вредности вероватноће грешке првог типа $\alpha=0,05$ и снаге студије од 0,95, укупна величина узорка процењена је на 96.

3.6. Методе генотипизације

Геномска DNA је изолована из узорака пуне крви користећи QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Концентрација DNA је мерена помоћу Qubit™ dsDNA HS Assay Kit употребом QubitR 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Све PCR реакције су извођене на Techne Genius PCR Thermal Cyclер (Techne, Cambridge, UK) у лабораторији Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.6.1. *PRSSI* генотипизација

Генотипизација за варијацију 365G>A (rs111033565, R122H) је изведена методом PCR-RFLP на основу публикације Masamune et al. (150) са мањом модификацијом PCR реагенаса и услова. PCR реакција је изведена у 16 μ l мешавине 0,2 μ M dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2,5mM MgCl₂, 0,2 μ l прајмера 5'-TGACCCACATCCCTCTGCTG-3' и 5'-TCTCCATTTGTCCTGTCTCT-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA), и ~20ng DNA у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). Услови реакције су подразумевали иницијалну денатурацију на 95°C у трајању од 5 минута; 30 циклуса денатурације на 95 °C у трајању од 1 минута, хибридизације прајмера на 64°C у трајању од 1 минут, елонгације на 72°C у трајању од 1 минута, и финалну елонгацију на 72°C 5 минута. Тако генерисани PCR производи дужине 615 bp у присуству 365G алела остају непресечени рестрикционим ензимом AflIII (NEB, Hertfordshire, UK) у току инкубације од 1 сат на 37°C. С друге стране, у присуству варијације 365A долази до пресецања PCR производа на фрагменте од 323 bp и 292 bp. PCR производи и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Генотипизација *PRSSI* за варијацију 86A>T (rs111033566, N29I) је спроведена PCR-RFLP методом по опису Mora et al (376) са мањом модификацијом PCR реагенаса и

услова. PCR реакција је изведена у 16 μ l реакционе смеше која је садржала ~20 ng DNA, 0,2 μ M dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μ l прајмера 5'-CGCCACCCCTAACATGCTAT-3' и 5'-CTCTCCCAGGCAGACTGGCC-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). Услови реакције су подразумевали иницијалну денатурацију на 95°C 5 min; 40 циклуса денатурације на 95 °C у трајању од 30 секунди, хибридизације на 64°C 30 секунди, елонгације на 72°C у трајању од 30 секунди и финалну елонгацију на 72°C 5 минута. Резултат апмплификације су 266 bp дуги PCR производи, на које је током процеса рестрикције деловао ензим TaaI (Thermo Scientific, Waltham, MA). Под дејством поменутог ензима у случају дивљег алела у току инкубације од 2 сата на 65°C долази до пресецања PCR производа на три фрагмента од 102 bp, 79 bp и 85 bp, док варијантни 86T алел даје два фрагмента дужине 181 bp и 85 bp. PCR производи и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.6.2. *SPINK1* генотипизација

Генотипизација *SPINK1* 101A>G (rs17107315, N34S) је учињена коришћењем PCR-RFLP метода према публикацији Gomez-Lira et al.(54) са мањом модификацијом PCR реагенаса и услова. Укратко, 138 bp *SPINK1* секвенца је амплификована у укупној PCR мешавини у количини од 18 µl, укључујући ~20 ng DNA, 0,2 µM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µl прајмера 5'-CAATCACAGTTATTCCCCAG-3' и 5'-TGGTGCATCCATTAAGTGCA-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). PCR реакција се одвијала процесом иницијалне денатурације на 95 °C у трајању од 5 минута, затим 35 циклуса денатурације на 94 °C 30 секунди, хибридизације на 54 °C 30 секунди, елонгације на 72 °C у трајању од 1 минута, и на крају финална елонгација на 72 °C у трајању од 5 минута. Рестрикциони ензим Bsp1286I (Thermo Scientific, Waltham, MA) пресецао је само варијантни алел на фрагменте дужине 122 bp и 16 bp у току инкубације од 1 сат на 37°C, док је дивљи тип 101A остајао непресечен. PCR продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.6.3. CFTR генотипизација

Генотипизација варијације 1408G>A (rs213950, M470V) је урађена коришћењем метода PCR-RFLP према опису Qiao et al. (377) уз мање модификације PCR реагенса и услова. PCR реакција је изведена у мешавини укупне количине 15 µl, укључујући ~20 ng DNA, 0,2 µM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,7 mM MgCl₂, 0,2 µl прајмера 5'-CAAGTGAATCCTGAGCGTGA-3' и 5'-TCTAGTTGGCATGCTTTGATG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). PCR реакција се одвијала процесом иницијалне денатурације на 95 °C у трајању од 2 минута, затим 10 циклуса денатурације на 94 °C 1 минут, хибридизације на 60 °C 1 минут, елонгације на 70 °C у трајању од 90 секунди, а потом 20 циклуса денатурације на 90 °C 1 минут, хибридизације на 60 °C 1 минут, елонгације на 70 °C у трајању од 90 секунди, и на крају финална елонгација на 60 °C у трајању од 10 минута. Рестрикциони ензим HpaI (Thermo Scientific, Waltham, MA) је током инкубације од 1 сат на 37°C пресецао само варијантни алел на фрагменте дужине 161bp и 85 bp, док је дивљи тип 1408G од 246 bp остајао непресечен.

Генотипизација варијације IVS8-5T (rs1805177, 5T/7T/9T) је изведена PCR-RFLP методом према публикацији Shrimpton et al.(214) уз мању измену PCR реагенса и услова реакције. Реакција умножавања PCR продуката CF5T и CF7T дужине 259 bp, 261 bp и 263 bp је изведена у смеси укупне количине 16 µl следећег састава: ~20 ng DNA, 0,2 µM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2µl заједничког прајмера 5'-GACATGGACACCAAATTAAG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), CF5T прајмера 5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTTGTT-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и CF7T прајмера 5'-GTGTGTGTGTGTGTGTTTTGTT-3'(Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5 U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). PCR реакција се одвијала кроз 1 циклус иницијалне денатурације на 94 °C у трајању од 2 минута и 30 секунди, хибридизације на 58 °C 1 минут, елонгације на 72 °C у трајању од 1 минут, а потом 34 циклуса денатурације на 94 °C 1 минут, хибридизације на 58 °C 1 минут, елонгације на 72 °C 1 минут. Добијени PCR продукти су, зависно од тога да ли је у питању IVS8-5T, 7T или 9T, били дужине 259 bp, 261 bp или 263 bp. Рестрикциони ензим HpaI (Thermo Scientific, Waltham, MA) је током инкубације од 1 сата на 37°C пресецао

PCR продукте реакције са CF5T прајмером на фрагменте од 237 bp и 22 bp код 5T алела, док су код 7T алела и 9T алела остали непресечени. У случају реакције са CF7T прајмером, рестрикциони ензим је пресецао PCR продукте на фрагменте од 235 bp и 22 bp код 5T алела, 237 bp и 22 bp код 7T алела, а код 9T је остао непресечен. Генотип је утврђиван комбиновањем резултата из обе рестрикционе реакције.

Генотипизација варијације 350G>A (rs78655421, R117H) спроведена је PCR-RFLP методом према публикацији Shrimpton et al. (214) уз минималне промене. PCR реакција је изведена у смеши количине 18 µl, а која је садржала ~20 ng DNA, 0,2 µM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µl прајмера 5'-CCCGGATAACAAGGAGGAGC-3' и 5'-TTGTACCAGCTCACTACCTA -3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). PCR реакција се одвијала кроз 1 циклус иницијалне денатурације на 94 °C у трајању од 2 минута и 30 секунди, хибридизације на 58 °C 30 секунди, елонгације на 72 °C у трајању од 30 секунди, а потом 34 циклуса денатурације на 94 °C 1 минут, хибридизације на 58 °C 30 секунди, елонгације на 72 °C 30 секунди. Рестрикциони ензим HhaI (Thermo Scientific, Waltham, MA) је током инкубације од 1 сата на 37°C пресецао PCR продукте од 248 bp само ако је у питању дивљи тип алела, и то на фрагменте дужине 227bp и 21 bp, док је варијантни тип 350A остајао непресечен.

PCR продукти и рестрикциони фрагменти су идентификовани електрофорезом на 1,2% или 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.6.4. *TNF- α* генотипизација

Генотипизација варијације -238G>A (rs361525) је изведена методом PCR-RFLP на основу публикације Ozhan et al.(332), уз мање промене. PCR реакција је изведена у 15 μ l мешавине садржине 0,2 μ M dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,7mM MgCl₂, 0,2 μ l прајмера 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3' и 5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA), и ~20ng DNA у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). Овом реакцијом се добијају PCR продукти дужине 150 bp. Услови реакције су подразумевали иницијалну денатурацију на 94°C у трајању од 3 минута; 35 циклуса денатурације на 94 °C у трајању од 30 секунди, хибридизације на 57°C 30 секунди, елонгације на 72°C у трајању од 30 секунди; и финалну елонгацију на 72°C 5 минута. Овако генерисани PCR продукти у току 5 минута инкубације на 37°C у присуству варијантног -238A алела остају непресечени рестрикционим ензимом MspI (Thermo Scientific, Waltham, MA). С друге стране, у присуству дивљег типа алела -238G долази до пресецања на фрагменте од 130 bp и 20 bp. PCR продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Генотипизација варијације -308G>A (rs1800629) је урађена PCR-RFLP методом према публикацији Ozhan et al.(332) уз одређене промене услова реакције. PCR реакција је изведена у 18 μ l смеше која је садржала 0,2 μ M dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5mM MgCl₂, 0,2 μ l прајмера 5'- ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3' и 5'-AATAGGTTTTGAGGGCCATG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA), и ~20ng DNA у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). Услови реакције су подразумевали иницијалну денатурацију на 94°C у трајању од 3 минута; 35 циклуса денатурације на 94 °C у трајању од 30 секунди, хибридизације на 58°C 30 секунди, елонгације на 72°C у трајању од 30 секунди; и финалну елонгацију на 72°C 5 минута. Овако генерисани PCR продукти дужине 222 bp. У присуству варијантног -308A алела остају непресечени рестрикционим ензимом FastDigest NcoI (Thermo Scientific, Waltham, MA) у току 10 минута инкубације на 37°C . Међутим, у присуству дивљег типа алела -308G долази до пресецања на фрагменте дужине 206 bp и 16

вр. PCR продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 2,4% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.6.5. *TNF-β* генотипизација

Генотипизација 252G>A полиморфизма је учињена коришћењем PCR-RFLP метода према публикацији Zhang et al.(53) са мањом модификацијом PCR реагенаса и услова реакције. Секвенца NcoI дужине 782 bp је амплификована у реакционој смеси укупне количине од 15 µl састава : ~20 ng DNA, 0,2 µM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,7 mM MgCl₂, 0,2 µl прајмера 5'-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3' и 5'-AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U DreamTaqDNA полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1X PCR пуферу (Qiagen, Hilden, Germany). PCR реакција се одвијала процесом иницијалне денатурације на 95 °C у трајању од 3 минута; затим 37 циклуса денатурације на 95 °C 1 минут, хибридизације на 54 °C 1 минут, елонгације на 72 °C у трајању од 1 минута; и на крају финална елонгација на 72 °C у трајању од 5 минута. Рестрикциони ензим FastDigest NcoI (Thermo Scientific, Waltham, MA) пресецао је само варијантни алел на фрагменте дужине 196 bp и 586 bp у току инкубације од 10 минута на 37°C, док је дивљи тип алела остајао непресечен. PCR продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на 1,2% агарозном гелу обојеном Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.7. Статистичка обрада података

За статистичку анализу коришћен је програм SPSS Statistics, верзија 20 (IBM, Armonk, NY, USA). За хаплотипизацију и утврђивање учесталости хаплотипа коришћен је софтверски програм Arlequin, version 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Подаци о генотипу су приказани као учесталости алела, генотипа, хаплотипа и диплотипа. Нормалност расподеле континуираних варијабли испитана је Колмогоров-Смирнов тестом, а опсервиране и очекиване учесталости алела (Hardy-Weinberg равнотежа) упоређене су χ^2 тестом.

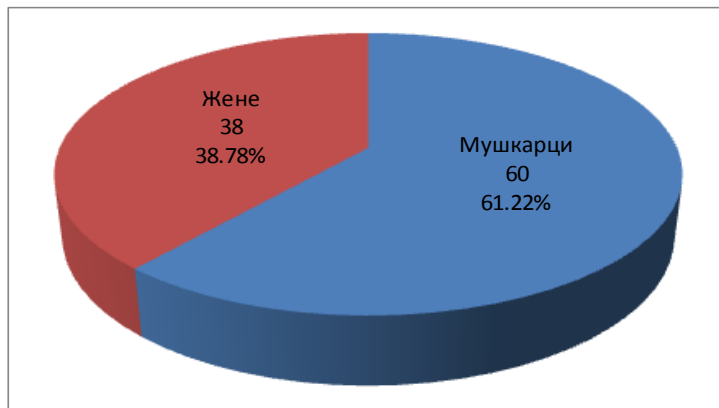
Fisher exact, Fisher-Freeman-Halton, Пирсонов χ^2 тест и логистичка регресија су коришћени ради упоређивања учесталости *CFTR* алела, генотипа, диплотипа и генотипских група (одређених користећи доминантни или рецесивни генетски модел), као и других карактеристика (пол, године, коморбидитети, етиологија панкреатитиса, коришћење алкохола, пушење цигарета) између пацијената са лаком и тешком формом акутног панкреатитиса. Повезаност *CFTR* генотипа и тежине акутног панкреатитиса је одређена процењивањем релативног ризика (RR) и odds ratio (OR) компликација и/или органске инсуфицијенције 95% интервалом поверења (95% CI). У свим тестовима статистичка значајност је одређена вредношћу $p < 0,05$. Резултати су приказани табеларно.

За статистичку анализу *PRSSI* и *SPINK1* коришћен је модификовани Wald метод у оквиру 95% интервала поверења. Подаци о генотипу су приказани кроз учесталости хаплотипа и генотипа. У свим тестовима статистичка значајност је одређена вредношћу $p < 0,05$. Резултати су приказани табеларно.

Повезаност *TNF* генотипа и генотипских група (одређених користећи доминантни или рецесивни генетски модел) са тежином акутног панкреатитиса и морталитетом због акутног панкреатитиса, као и повезаност других карактеристика пацијента (укључујући старост, пол, коморбидитете, етиологију панкреатитиса, пушење цигарета, коришћење нестероидних антиинфламаторних лекова) са морталитетом код акутног панкреатитиса, утврђивана је логистичком регресијом. Статистичка значајност је одређена вредношћу $p < 0,05$, а резултати су приказани као Odds Ratio (OR) са 95% интервалом поверења (95% CI). Резултати су приказани табеларно.

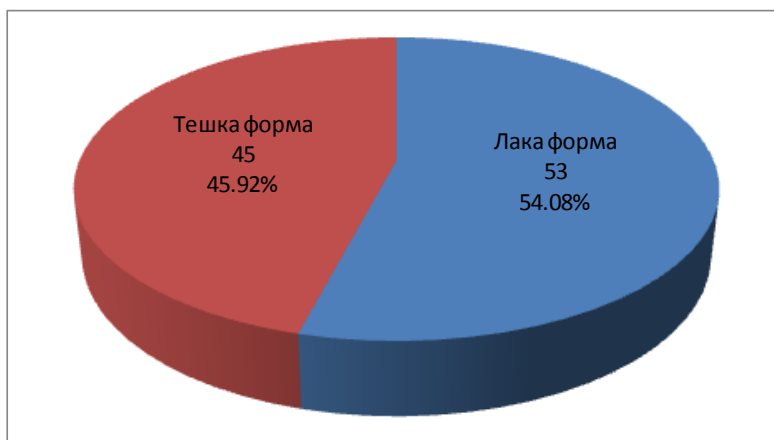
4. РЕЗУЛТАТИ

Укупно 98 пацијената је задовољило критеријуме за укључивање у студију. На графикону 1 је приказана дистрибуција акутног панкреатитиса према полу.



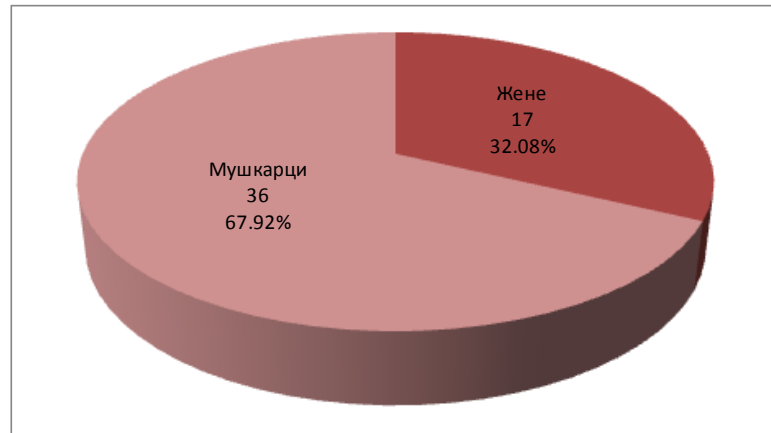
Графикон 1. Дистрибуција акутног панкреатитиса према полу

Просечна старост пацијената укључених у студију је била 61 година, а сви испитаници су старости у опсегу од 23 до 86 година. Индекс телесне масе ових пацијената се кретао од $19,2 \text{ kg/m}^2$ до $42,2 \text{ kg/m}^2$, са средњом вредношћу $27,2 \text{ kg/m}^2$. Расподела учесталости акутног панкреатитиса према тежини болести је приказана на графикону 2.



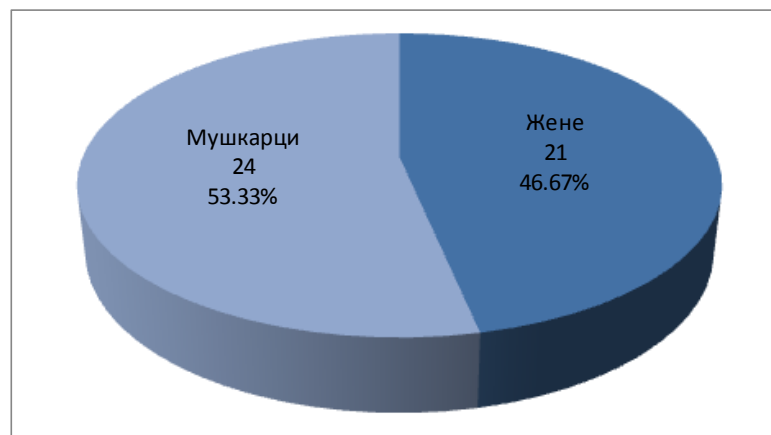
Графикон 2. Расподела учесталости акутног панкреатитиса према тежини болести

Расподела учесталости према полу у групи пацијената са лаког формом болести је приказана на графикону 3.



Графикон 3. Расподела учесталости према полу у групи пацијената са лаког формом болести

Заступљеност полова у групи пацијената са тешком формом болести је приказана на графикону 4.



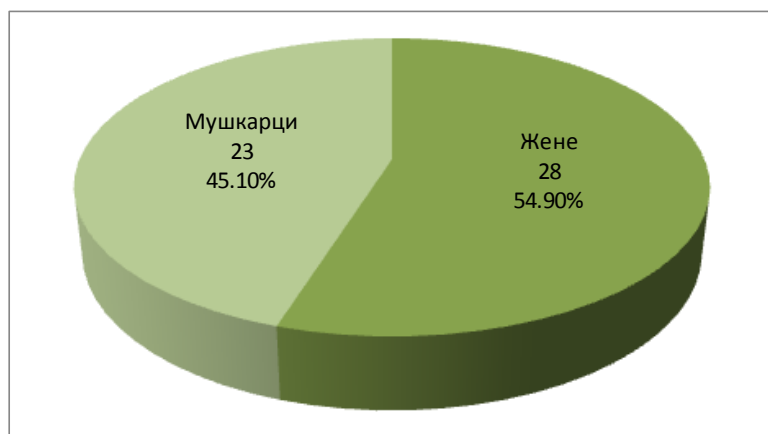
Графикон 4. Расподела учесталости према полу у групи пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса

Најзаступљенији етиолошки фактор у целом испитаном узорку је калкулоза жучне кесе и жучних водова. Билијарну етиологију акутног панкреатитиса је имао 51 пацијент, њих 25 је имало алкохолну етиологију, а код 25 пацијената је узрок био непознат. Процентуална расподела учесталости етиолошких фактора је приказана на графикону 5.



Графикон 5. Расподела учесталости акутног панкреатитиса према етиологији

На графикону 6 је приказана расподела учесталости полова код акутног билијарног перитонитиса.



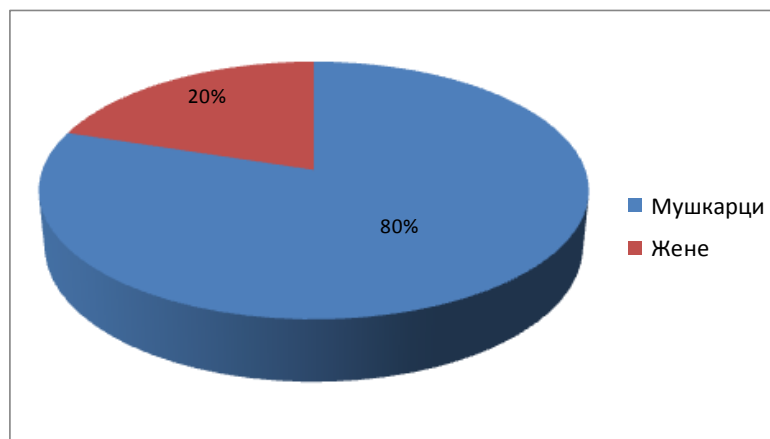
Графикон 6. Расподела учесталости полова код акутног билијарног перитонитиса

Од алкохолног акутног панкреатитиса је оболело више мушкараца, а расподела учесталости полова код ове врсте панкреатитиса је приказана на графикону 7.



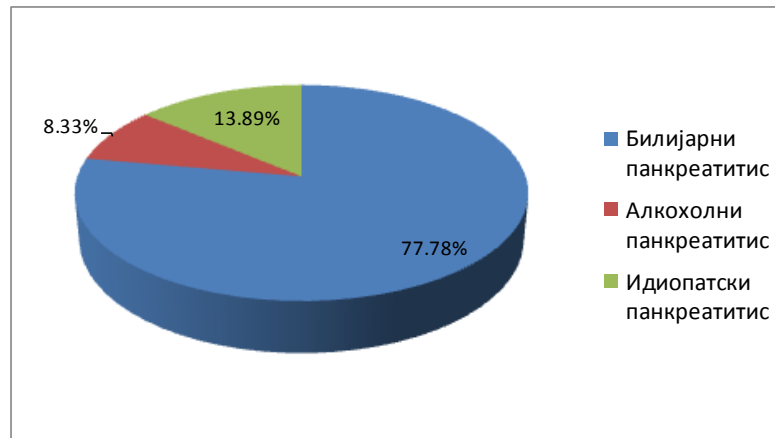
Графикон 7. Расподела учесталости полова код алкохолног акутног панкреатитиса

Дијагнозу идиопатског акутног панкреатитиса смо чешће постављали код мушкараца. Расподела учесталости полова код идиопатског акутног панкреатитиса је приказана на графикону 8.



Графикон 8. Расподела учесталости полова код идиопатског акутног панкреатитиса

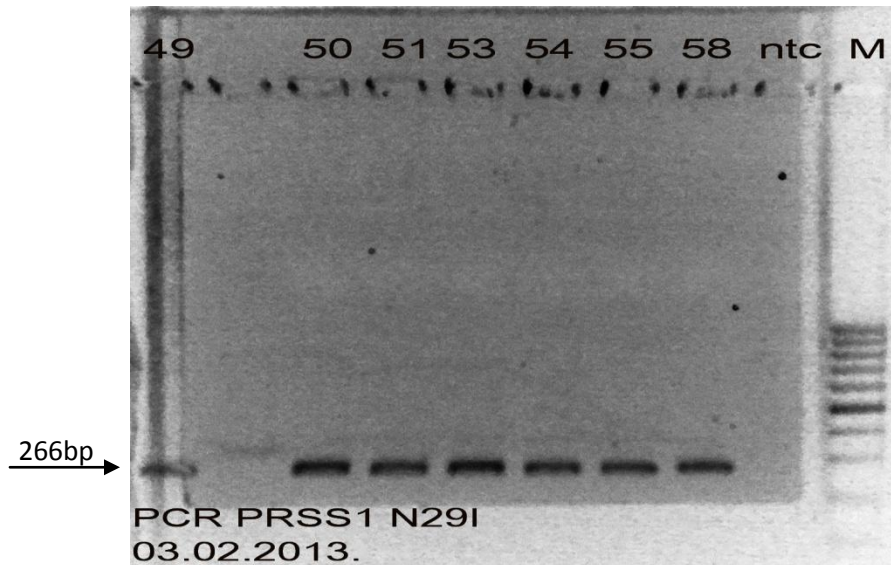
Као што је и очекивано, најчешћи тип акутног панкреатитиса код жена је билијарни ($\chi^2=15.3$, $p<0.0001$). Расподела учесталости врсте акутног панкреатитиса према етиолошком фактору код жена је приказана на графикону 9.



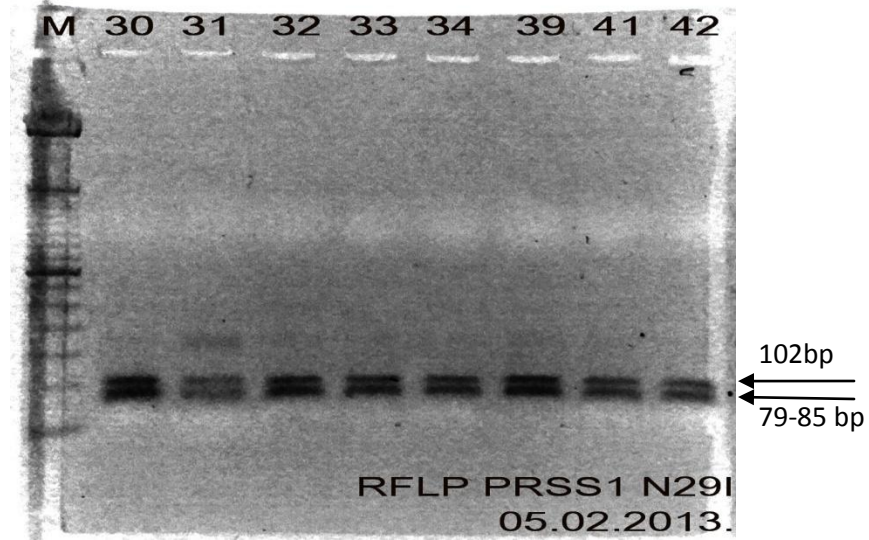
Графикон 9. Расподела врсте акутног панкреатитиса према етиолошком фактору код жена

4.1. Полиморфизми *PRSSI* гена

У нашем испитаном узорку није идентификован ниједан пацијент са *PRSSI* 86A>T (N29I) и 365G>A (R122H) полиморфизмом. На слици 1 је приказан пример амплификованих PCR продуката *PRSSI* 86A>T дужине 266bp, а на слици 2 је приказан пример PCR продуката *PRSSI* 86A>T полиморфизма након рестрикције тј. приказани су узорци хомозиготних носилаца 86A/A алела који су пресечени на 3 фрагмента дужине 102bp, 79bp и 85bp, а нема фрагмената од 181bp који би указао на присуство варијантног алела 86G/G.

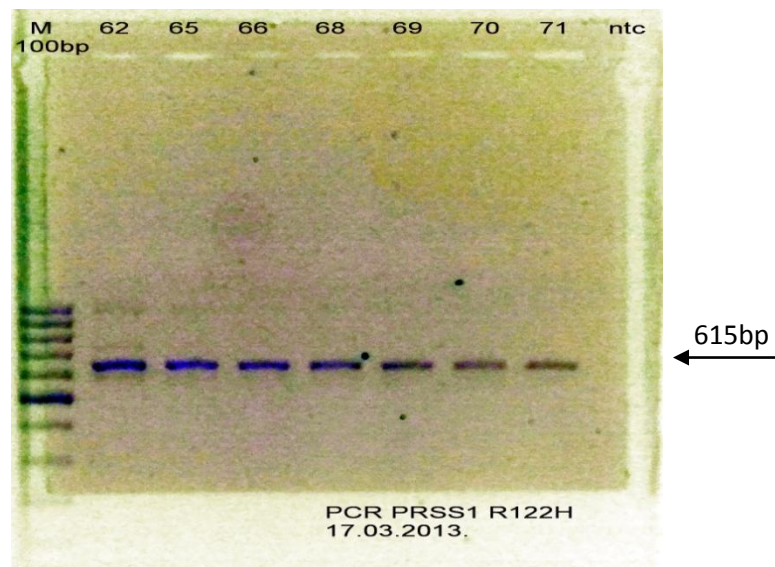


Слика 1. Пример амплификованих PCR продуката *PRSSI* 86A>T (rs111033566, N29I). Колона М - 100bp ДНК маркер; колона ntc (non template control – контрола без узорка); колоне 50-58 : PCR продукти

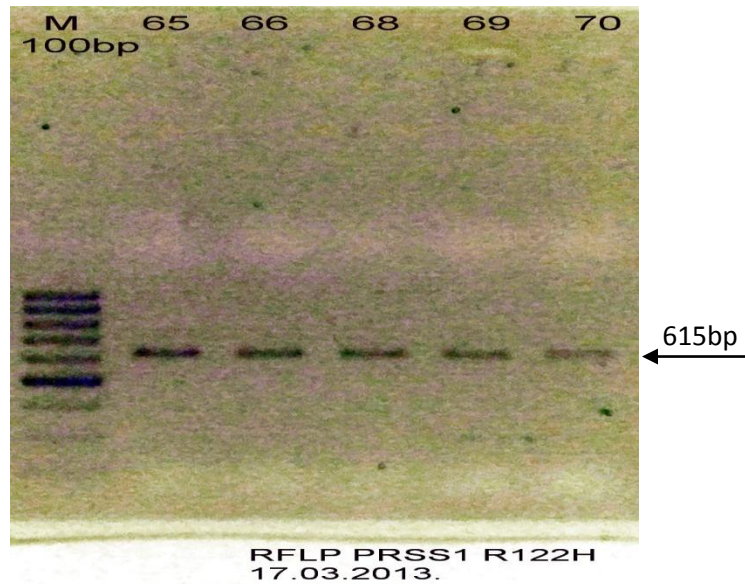


Слика 2. Пример рестрикције PCR продуката *PRSS1* 86A>T (rs111033566, N29I). Колона М - 50bp ДНК маркер; колоне 30-42 - PCR продукти након рестрикције

На слици 3 је приказан пример амплификованих PCR продуката *PRSS1* 365G>А полиморфизма дужине 615bp, а на слици 4 је приказан пример PCR продуката *PRSS1* 365G>А полиморфизма након рестрикције тј. приказани су узорци хомозиготних носилаца 365G/G алела који су остали непресечени.



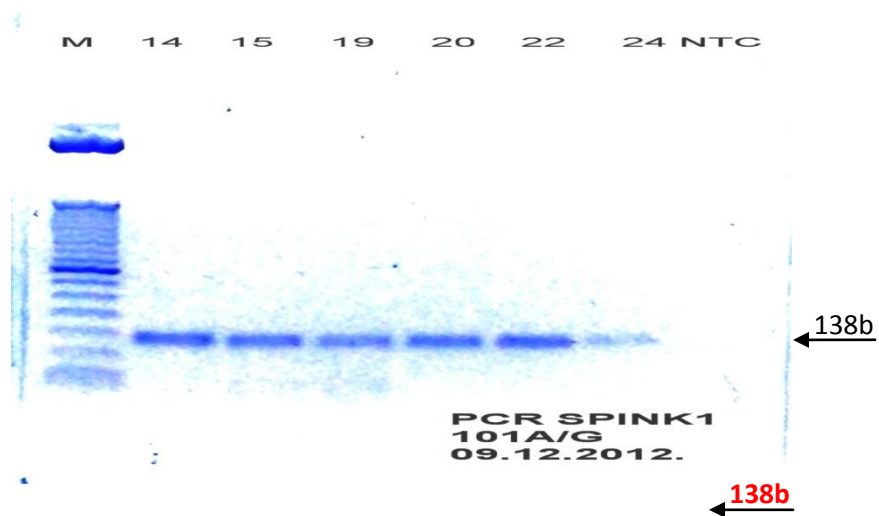
Слика 3. Пример амплификованих PCR продуката *PRSSI* 365G>A (rs111033565, R122H). Колона М - 100bp ДНК маркер; колона ntc (non template control – контрола без узорка); колоне 62-71 : PCR продукти



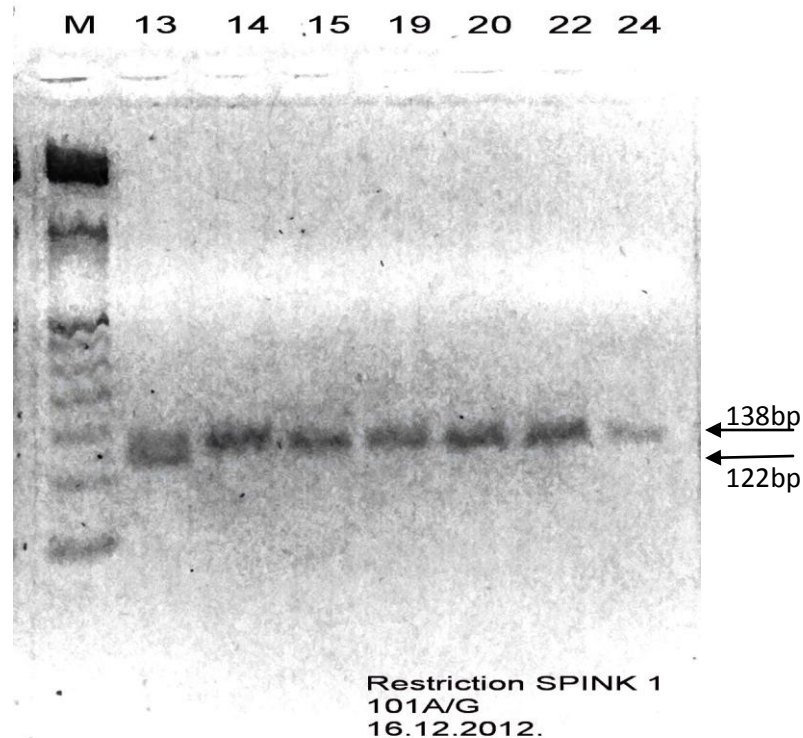
Слика 4. Пример рестрикције PCR продуката *PRSSI* 365G>A (rs111033565, R122H). Колона М - 100bp ДНК маркер; колоне 65-70 - PCR продукти након рестрикције

4.2. Полиморфизам *SPINK1* гена

*SPINK1*101A>G (N34S) је идентификован код једног пацијента који је хетерозиготни носилац 101G алела. Пример амплификованих продуката *SPINK1* 101A>G полиморфизма дужине 138bp приказан је на слици 5. На слици 6 је приказан резултат рестрикције PCR продуката *SPINK1* 101A>G, при чему су сви узорци хомозиготи 101A/A (остали су непресечени), а узорак 13 је хетерозигот 101A/G (присутне су две линије – непресечени 101A од 138bp и 101G пресечен на 122bp и 16bp).



Слика 5. Пример амплификованих PCR продуката *SPINK1* 101A>G (rs17107315, N34S). Колона М - 50bp ДНК маркер; колона NTC (non template control – контрола без узорка); колоне 14-24 : PCR продукти



Слика 6. Пример рестрикције PCR продукта *SPINK1* 101A>G (rs17107315, N34S). Колона М - 50bp ДНК маркер; колоне 13-24 - PCR продукти након рестрикције

Учесталост овог алела је 0,51%. Пацијент је био старости 48 година, гојазан по конституцији (BMI:29.3 kg/m²), пушач цигарета (20 цигарета дневно), конзумирао је алкохол (3 алкохолна пића дневно), и са калулозом жучне кесе. Категорисан је у групу пацијената са тешком клиничком сликом, развио је акутни некротизујући панкреатитис са локалном компликацијом у виду псеудоцисте. Ради се о пацијенту коме је ово био први напад акутног панкреатитиса, и ниједан члан његове породице никада у свом животу није имао потврђену дијагнозу панкреатитиса. Пацијент је са болничког лечења отпуштен кући потпуно опорављен, а лечен је неоперативно, надокнадом течности и електролита, нутритивном подршком, аналгетикама, антибиотикама и инхибиторима протонске пумпе.

4.3. Полиморфизми *CFTR* гена

Све учесталости *CFTR* генотипа су у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом ($\chi^2 < 3.346$, $p = 0.05$). Учесталости *CFTR* алела, генотипа и генотипских група у категоријама са лаком ($n = 53$) и тешком формом болести ($n = 45$) су приказане у табели 3.

CFTR 350G>A варијација (R117H) није идентификована ни код једног пацијента у испитаној популацији. Поређењем учесталости *CFTR* 1408G>A варијације (M470V) код лаке и тешке форме болести није утврђена повезаност *CFTR* 1408G и *CFTR* 1408A алела са тежином клиничке слике ($p = 0,630$). Испитан је утицај дужине политимидинског тракта на тежину болести, па су испитаници подељени у две групе: а) носиоци најкраћег политимидинског тракта (5T алела) и они који то нису, б) носиоци најдужег политимидинског тракта (9T алела) и они који то нису. Упоређивањем учесталости испитаника који су носиоци најмање једног 5T алела наспрам оних који то нису, утврђено је да 5T алел не утиче на тежину клиничке слике ($p = 0,282$). На сличан начин, упоређивањем учесталости испитаника који су носиоци најмање једног 9T алела наспрам оних који то нису, утврђено је да носиоци 9T алела такође не узрокују настанак теже форме акутног панкреатитиса ($p = 0,411$). Упоређивањем учесталости генотипских група није утврђена значајна разлика између пацијената са лаком и пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса. Генотипске групе су одређене користећи се доминантним и рецесивним генетским моделима. Доминантни генетски модел је подразумевао поређење учесталости хомозиготних носилаца дивљег типа алела са учесталошћу носилаца најмање једног варијантног алела, а рецесивни генетски модел је коришћен за поређење учесталости носилаца најмање једног дивљег типа алела са учесталошћу хомозиготних носилаца варијантног алела.

Табела 3. Учесталости *CFTR* алела, генотипа и генотипских група код пацијената са лаким (n=53) и тешким (n=45) обликом акутног панкреатитиса

Алел		Лака форма акутног панкреатитиса	Тешка форма акутног панкреатитиса	p
rs1805177 (IVS8 poly-T)				
	IVS8 5T	0.057 (6/106)	0.022 (2/90)	0.211
	IVS8 7T	0.755 (80/106)	0.700 (63/90)	
	IVS8 9T	0.189 (20/106)	0.278 (25/90)	
	IVS8 non 5T	0.943 (100/106)	0.978 (88/90)	0.225
	IVS8 non 9T	0.811 (86/106)	0.722 (65/90)	0.139
rs78655421 (350G>A, R117H)				
	350G	1.000 (106/106)	1.000 (90/90)	1.000
	350A	0.000 (0/106)	0.000 (0/90)	
rs213950 (1408G>A, M470V)				
	1408G	0.443 (47/106)	0.478 (43/90)	0.630
	1408A	0.557 (59/106)	0.522 (47/90)	
Генотип				
rs1805177 (IVS8 poly-T)				
	5T/5T	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	0.370
	5T/7T	0.038 (2/53)	0.022 (1/45)	
	5T/9T	0.075 (4/53)	0.022 (1/45)	
	7T/7T	0.660 (35/53)	0.556 (25/45)	
	7T/9T	0.151 (8/53)	0.267 (12/45)	
	9T/9T	0.075 (4/53)	0.133 (6/45)	
	5T/non5T	0.113 (6/53)	0.044 (2/45)	0.282
	non5T/non5T	0.887 (47/53)	0.956 (43/45)	
	9T/non9T	0.226 (12/53)	0.289 (13/45)	0.411
	non9T/non9T	0.698 (37/53)	0.578 (26/45)	
rs78655421 (350G>A, R117H)				
	G/G	1.000 (53/53)	1.000 (45/45)	1.000
	G/A	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	
	A/A	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	
rs213950 (1408G>A, M470V)				
	G/G	0.189 (10/53)	0.222 (10/45)	0.896
	G/A	0.509 (27/53)	0.511 (23/45)	
	A/A	0.302 (16/53)	0.267 (12/45)	
Генотипска група				
Доминантни генетски модел				
rs1805177 (IVS8 poly-T)				
	5T/non5T + non5T/non5T	1.000 (53/53)	1.000 (45/45)	NA
	9T/non9T + non9T/non9T	0.925 (49/53)	0.867 (39/45)	0.505
rs213950 (1408G>A, M470V)				
	G/A+A/A	0.811 (43/53)	0.778 (35/45)	0.803
Рецесивни генетски модел				
rs1805177 (IVS8 poly-T)				
	5T/5T + 5T/non5T	0.113 (6/53)	0.044 (2/45)	0.282
	9T/9T + 9T/non9T	0.302 (16/53)	0.422 (19/45)	0.290

rs213950 (1408G>A, M470V)	G/G+G/A	0.698 (37/53)	0.733 (33/45)	0.823
-------------------------------------	---------	---------------	---------------	-------

Даље, поређењем учесталости *CFTR* хаплотипа и диплотипа код пацијената са лаком и тешком формом акутног панкреатитиса, нису утврђене значајне разлике (Табела 4).

Испитивањем повезаности и других варијабли на тежину акутног панкреатитиса, утврђено је да од свих варијабли које су испитане (старост, пол, коморбидитети изражени кроз Charlson Comorbidity Index – CCI, етиологија акутног панкреатитиса, употреба алкохола, пушење цигарета), једино је CCI удружен са тежим обликом акутног панкреатитиса ($p=0.022$).

Табела 4. Учесталости *CFTR* хаплотипа и диплотипа код пацијената са лаким (n=53) и тешким (n=45) обликом акутног панкреатитиса

	Лака форма акутног панкреатитиса	Тешка форма акутног панкреатитиса	p
Хаплотип			
rs1805177-rs78655421-rs213950			
5T-350G-1408A	0.019 (2/106)	0.000 (0/90)	0.554
5T-350G-1408G	0.038 (4/106)	0.022 (2/90)	
7T-350G-1408A	0.500 (53/106)	0.467 (42/90)	
7T-350G-1408G	0.255 (27/106)	0.233 (21/90)	
9T-350G-1408A	0.038 (4/106)	0.056 (5/90)	
9T-350G-1408G	0.151 (16/106)	0.222 (20/90)	
Диплотип			
rs1805177-rs78655421-rs213950			
5T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)	0.739
5T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)	
5T-350G-1408G/7T-350G-1408G	0.019 (1/53)	0.022 (1/45)	
5T-350G-1408G/9T-350G-1408G	0.038 (2/53)	0.022 (1/45)	
7T-350G-1408A/7T-350G-1408A	0.283 (15/53)	0.222 (10/45)	
7T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.000 (0/53)	0.022 (1/45)	
7T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.283 (15/53)	0.289 (13/45)	
7T-350G-1408G/7T-350G-1408G	0.094 (5/53)	0.044 (2/45)	
7T-350G-1408G/9T-350G-1408G	0.019 (1/53)	0.067 (3/45)	
9T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.00 (0/53)	0.022 (1/45)	
9T-350G-1408G/5T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)	
9T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.132 (7/53)	0.178 (8/45)	
9T-350G-1408G/9T-350G-1408A	0.057 (3/53)	0.044 (2/45)	

С циљем утврђивања полних разлика у утицају различите дужине политимидинског тракта на тежину болести, испитана је учесталост *CFTR* IVS8 poly-T алела, генотипа и генотипских група посебно код особа мушког и женског пола оболелих од акутног панкреатитиса. Резултати су приказани у Табели 5. Они показују да је ризик да особа женског пола оболела од акутног панкреатитиса развије тешку форму болести, већи за више него двоструко, уколико је носилац бар једног *CFTR* IVS8 9T алела (RR за 9T/9T+9T/non9T vs. non9T/non9T: 2.115; 95% CI: 1.241-3.605).

Табела 5. Полна дистрибуција учесталости *CFTR* IVS8 poly-T алела, генотипа и генотипских група код акутног панкреатитиса

	Мушкарци (n=60)			Жене (n=38)		
	Лака форма	Тешка форма	p	Лака форма	Тешка форма	p
Алел						
IVS8 5T	0.083 (6/72)	0.042 (2/48)	0.587	0.000 (0/34)	0.000 (0/42)	0.017
IVS8 7T	0.694 (50/72)	0.771 (37/48)		0.882 (30/34)	0.619 (26/42)	
IVS8 9T	0.222 (16/72)	0.188 (9/48)		0.118 (4/34)	0.381 (16/42)	
Генотип						
5T/5T	0.000 (0/36)	0.000 (0/24)	0.954	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	0.017
5T/7T	0.056 (2/36)	0.042 (1/24)		0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	
5T/9T	0.111 (4/36)	0.042 (1/24)		0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	
7T/7T	0.565 (20/36)	0.625 (15/24)		0.882 (15/17)	0.476 (10/21)	
7T/9T	0.222 (8/36)	0.250 (6/24)		0.000 (0/17)	0.286 (6/21)	
9T/9T	0.056 (2/36)	0.042 (1/24)		0.118 (2/17)	0.238 (5/21)	
5T/non5T	0.167 (6/36)	0.083 (2/24)	0.457	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	NA
non5T/non5T	0.833 (30/36)	0.917 (22/24)		1.000 (17/17)	1.000 (21/21)	
9T/non9T	0.333 (12/36)	0.292 (7/24)	0.902	0.000 (0/17)	0.286 (6/17)	0.017
non9T/non9T	0.611 (22/36)	0.667 (16/24)		0.882 (15/17)	0.476 (10/17)	
Генотипска група						
Доминантни генетски модел						
5T/non5T + non5T/non5T	1.000 (36/36)	1.000 (24/24)	NA	1.000 (17/17)	1.000 (21/21)	NA
9T/non9T + non9T/non9T	0.944 (34/36)	0.958 (23/24)	1.000	0.882 (15/17)	0.762 (16/21)	0.427
Рецесивни генетски модел						
5T/5T + 5T/non5T	0.167 (6/36)	0.083 (2/24)	0.457	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	NA
9T/9T + 9T/non9T	0.389 (14/36)	0.333 (8/24)	0.787	0.118 (2/17)	0.524 (11/21)	0.015

Додатним испитивањем заступљености хаплотипа и диплотипа према полу и тежини клиничке слике, утврђено је да постоји разлика између мушкараца и жена. Резултати показују да је у групи пацијената са тешком клиничком сликом, значајно већа учесталост пацијенткиња носилаца бар једног хаплотипа 9T-350G-1408G ($p=0.021$). Притом, код мушкараца није показан утицај 1408G>A (M470V) генотипа ($p=0.545$), нити је показан утицај *CFTR* IVS8 9T алела на тежину болести (RR за 9T/9T+9T/non9T vs. non9T/non9T: 1.158; 95% CI: 0.594-2.256).

С обзиром на билијарну етиологију као најчешћи фактор узрочник акутног панкреатитиса код жена, испитана је удруженост ове етиологије код жена са тежином болести и присуством *CFTR* IVS8 9T алела. Релативни ризик је у овом случају без значаја (RR за 9T/9T+9T/non9T vs. non9T/non9T: 1.123; 95% CI: 0.709-1.778), тако да није утврђена повезаност *CFTR* IVS8 9T алела и тежине болести са билијарном етиологијом.

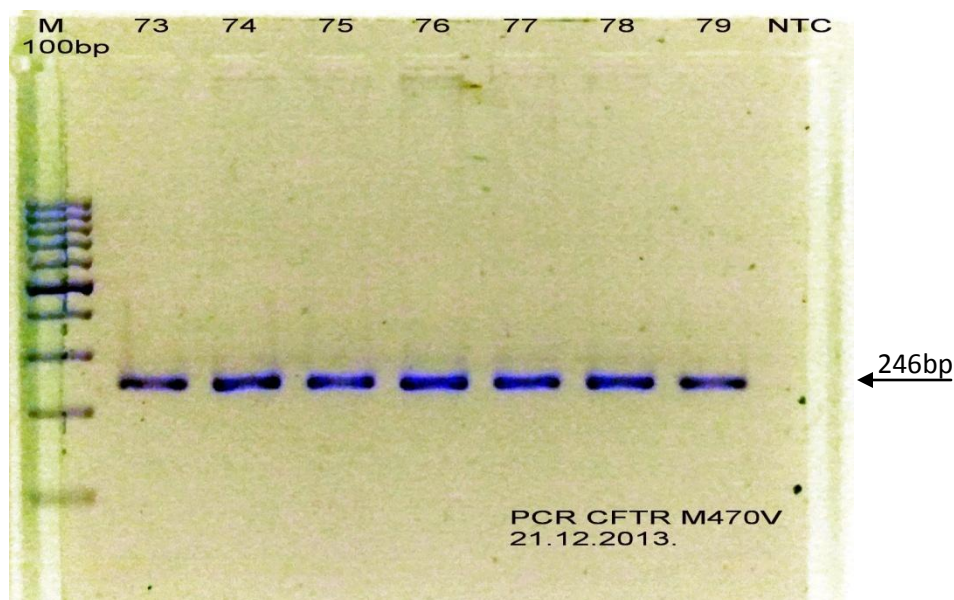
Значај *CFTR* IVS8 9T алела за развој тешке форме болести код жена оболелих од акутног панкреатитиса, утврђен је и тестом логистичке регресије, и то униваријабилном ($p=0.015$) и мултиваријабилном ($p=0.030$) логистичком регресијом. Међутим, логистичка регресија није утврдила значај других испитиваних варијабли ($p=0.308$). Статистички модел који се односи на генотип, старост пацијента и његове коморбидитете (Cox & Snell R^2 : 0.252, Nagelkerke R^2 : 0.337, Hosmer-Lemeshow $\chi^2=4.642$, $df=8$, $p=0.795$), најбоље показује рецесивни ефекат *CFTR* IVS8 9T алела на тежину акутног панкреатитиса код жена. Резултати који се односе на наведено су приказани у Табели 6.

Табела 6. Кратак преглед утицаја генотипа, коморбидитета и година на тежину акутног панкреатитиса код жена (n=38)

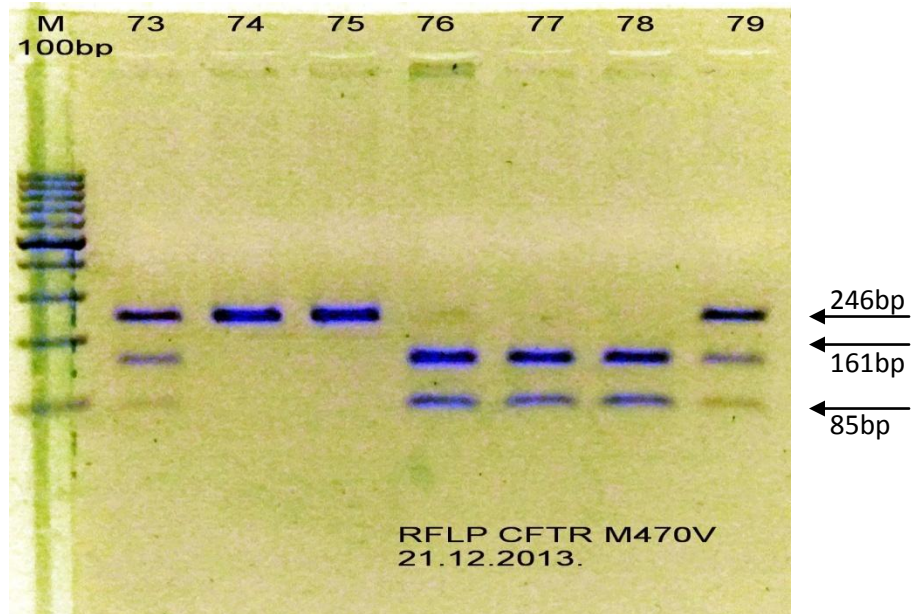
Варијабле	β	SE	Wald χ^2	p	OR	95% CI
Рецесивни <i>CFTR IVS8 9T</i> генетски модел	2.533	1.009	6.298	0.012	12.594	1.741-91.074
Charlson-ов индекс коморбидитета	0.294	0.418	0.495	0.482	1.342	0.591-3.044
Старост	0.040	0.030	1.791	0.181	1.041	0.982-1.104

β – регресиони коефицијент; SE – стандардна грешка регресионог коефицијента; Wald χ^2 – Wald-ов тест за DF=1; p – вредност вероватноће; OR – Odds Ratio (однос шанси); 95% CI – 95% интервал поверења за процењени OR

На слици 7 је дат пример амплификованих PCR продуката *CFTR* 1408G>A дужине 246bp, а на слици 8 су примери узорака носилаца и дивљег (непресечен) и варијантног типа (пресечен на фрагменте дужине 161bp и 85bp) M470V полиморфизма. Узорци 74 и 75 су хомозиготи 1408G/G, узорци 73 и 79 су хетерозиготи 1408G/A, узорци 76, 77 и 78 су хомозиготи 1408A/A.

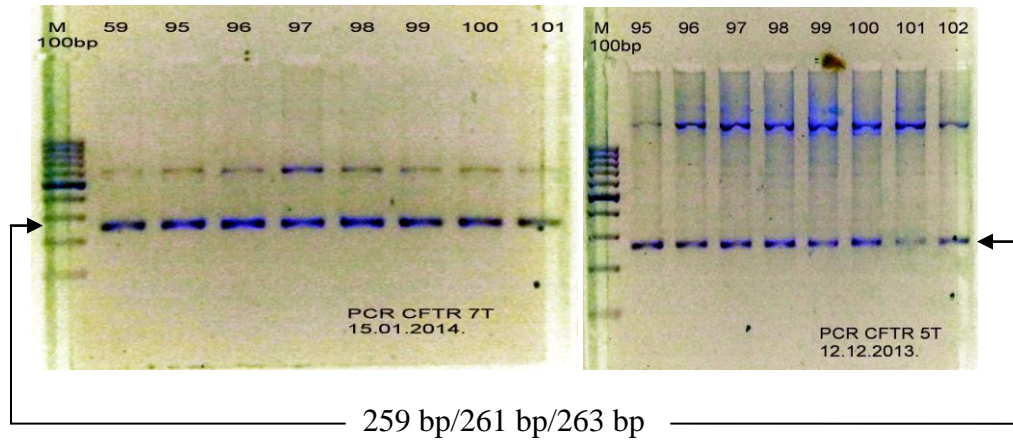


Слика 7. Пример амплификованих PCR продуката *CFTR* 1408G>A (rs213950, M470V). Колона М - 100bp ДНК маркер; колона NTC (non template control – контрола без узорка); колоне 73-79: PCR продукти

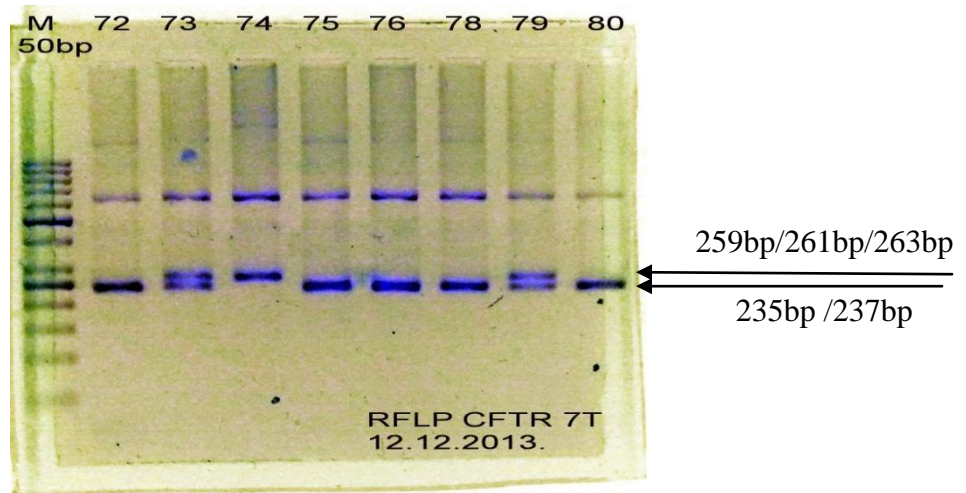


Слика 8. Пример рестрикције PCR продуката *CFTR* 1408G>A (rs213950, M470V). Колона М: 100bp ДНК маркер; колоне 73-79: PCR продукти након рестрикције

На слици 9 је приказан пример умножених PCR продуката CF5T и CF7T IVS8 poly-T, а на слици 10 је пример рестрикције умножених PCR продуката CF7T, након чега су се коначни резултати добили комбинацијом резултата рестрикције CF5T и CF7T. Резултати приказани на слици 10 се могу тумачити на следећи начин: PCR продукти узорака 72, 75, 76, 78 и 80 су пресечени и они могу бити 5T или 7T алели, након чега се рестрикцијом PCR продуката CF5T одлучило да ли се ради о 5T или 7T алелу. Узорак 74 је остао непресечен и ради се о хомозиготном носиоцу 9T/9T. Узорци 73 и 79 имају пресечене рестрикционе фрагменте и непресечене PCR продукте, што значи да су то хетерозиготни носиоци 9T алела на једном хромозому и 5T или 7T алела на другом.

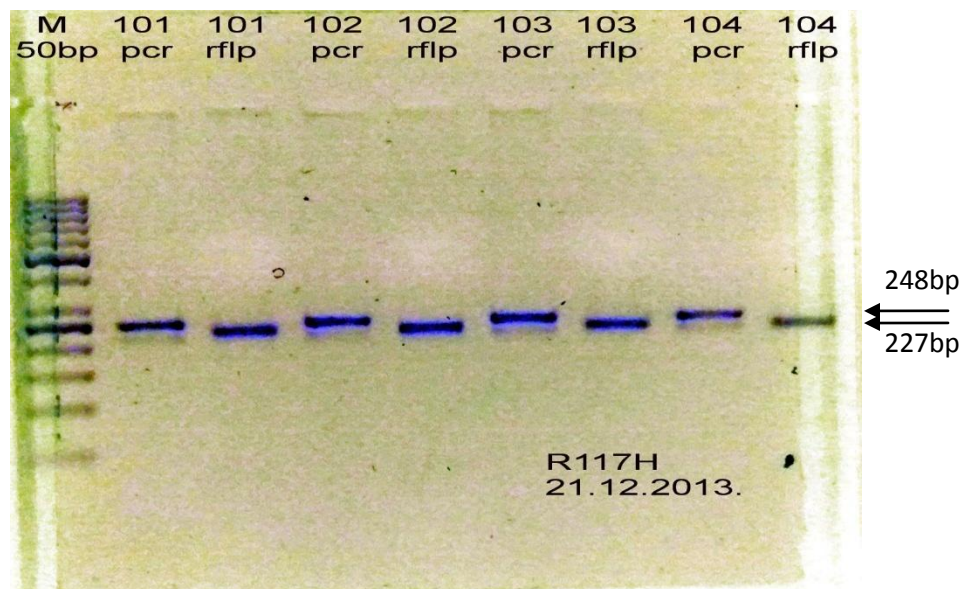


Слика 9. Пример умножених PCR продуката CF5T и CF7T IVS8 poly-T (rs1805177, 5T/7T/9T) . Колона М - 100bp ДНК маркер; колоне 59-102: PCR продукти дужине 259 bp, 261 bp и 263 bp.



Слика 10. Пример рестрикције умножених PCR продуката CF7T

На слици 11 су приказани примери ампликона полиморфизма *CFTR* 350G>A дужине 248bp и узорци носилаца дивљег типа алела 350G након рестрикције (PCR продукт је пресечен - рестрикциони фрагменти дужине 227bp и 21bp).



Слика 11. Пример рестрикције PCR продукта *CFTR* 350G>A (rs78655421, R117H). Колона М: 50bp ДНК маркер; колоне 101-104: PCR продукти и њима одговарајући рестрикциони фрагменти

4.4. Полиморфизми *TNF- α* и *TNF- β* гена

Све учесталости *TNF* генотипа су у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом ($\chi^2 < 0.023$, $p = 0.05$).

У табели 7 приказана је дистрибуција учесталости *TNF* алела, генотипа и генотипских група према тежини и смртности код пацијената са акутним панкреатитисом. Поређењем учесталости *TNF* алела и генотипа код лаке и тешке форме болести, није утврђена повезаност са тежином клиничке слике. Такође, није уочена значајна разлика ни у дистрибуцији учесталости у односу на групу преживелих и умрлих, тако да повезаност *TNF* алела и генотипа са исходом акутног панкреатитиса није утврђена. Да бисмо даље пронашли евентуалну повезаност генотипа са тежином клиничке слике и исходом код акутног панкреатитиса, формирали смо генотипске групе, и то користећи доминантни и рецесивни генетски модел. Доминантним генетским моделом смо поредили учесталости хомозиготних носилаца дивљег типа алела са учесталошћу носилаца најмање једног варијантног алела, а рецесивни генетски модел је коришћен за поређење учесталости носилаца најмање једног дивљег типа алела са учесталошћу хомозиготних носилаца варијантног алела. Упоредивањем учесталости генотипских група није утврђена статистички значајна разлика код пацијената са лаком и са тешком формом акутног панкреатитиса. Исто тако, није показан утицај ни на исход болести.

Логистичком регресијом смо испитали утицај и осталих варијабли (старост, пол, придружене хроничне болести изражене кроз ССИ, етиологија акутног панкреатитиса, пушење цигарета, коришћење NSAID-а) на тежину болести и смртни исход. Овим тестирањем није утврђена статистички значајна повезаност са тежином болести и морталитетом код акутног панкреатитиса, осим старости. Дакле, резултат показује да су од свих испитаних варијабли, једино године пацијента удружене са смртним исходом код акутног панкреатитиса. Треба напоменути да је ризик за смртним исходом код акутног панкреатитиса у позним годинама већи само за 8% (OR 1.080, 95% CI: 1.023-1.141).

Узимајући у обзир старост пацијента, пол, пропратне болести и доминантни генетски модел (Nagelkerke R²: 0.306, Hosmer-Lemeshow $\chi^2 = 5.664$, $df = 8$, $p = 0.685$), дошли смо до најбољег статистичког модела који показује значај ових варијабли за смртни исход код акутног панкреатитиса. Утврдили смо да пацијенти оболели од акутног

панкреатитиса, који су притом носиоци најмање једног варијантног *TNF- α* -308A алела, имају повољнији исход у односу на остале који нису носиоци овог алела, зато што је у првом случају ризик за смртни исход скоро 10 пута мањи (OR: 0.104), иако нам 95% интервал поверења указује на то да статистичка значајност није постигнута (95% CI: 0.010-1.105). Користећи исти модел, потврдили смо претходно наведен резултат који је указао на повезаност година пацијента са морталитетом (OR: 1.076, 95% CI: 1.014-1.143). У табели 8 су приказани резултати даљег испитивања могуће повезаности варијабли и смртног исхода код акутног панкреатитиса. Ово додатно испитивање је поменуто повезаност тестирало мултиплом логистичком регресијом (Nagelkerke R²: 0.273, Hosmer-Lemeshow $\chi^2=5.944$, df=8, p=0.654), и утврдили смо да претходно уочени ефекат *TNF- α* -308G>A полиморфизма постаје значајнији с годинама, зато што старији носиоци овог алела имају већу вероватноћу да преживе акутни панкреатитис.

Табела 7. Учесталости *TNF* алела, генотипа и генотипских група код пацијената са акутним панкреатитисом (n=98), сврстане према тежини болести и морталитету

	Тежина			Морталитет		
	Лака (n=53)	Тешка (n=45)	OR (95% CI)	Преживели (n=84)	Умрли (n=14)	OR (95% CI)
Алел						
<i>TNF-α -238G>A</i>						
G	104 (98.1%)	88 (97.8%)	NA	164 (97.6%)	28 (100.0%)	NA
A	2 (1.9%)	2 (2.2%)		4 (2.4%)	0 (0.0%)	
<i>TNF-α -308G>A</i>						
G	92 (86.8%)	78 (86.7%)	NA	143 (85.1%)	27 (96.4%)	NA
A	14 (13.2%)	12 (13.3%)		25 (14.9%)	1 (3.6%)	
<i>TNF-β 252G>A</i>						
G	83 (78.3%)	69 (76.7%)	NA	130 (77.4%)	22 (78.6%)	NA
A	23 (21.7%)	21 (23.3%)		38 (22.6%)	6 (21.4%)	
Генотип						
<i>TNF-α -238G>A</i>						
G/G	51 (96.2%)	43 (95.6%)	1.19 (0.16-8.78)	80 (95.2%)	14 (100.0%)	0.00 (0.00-NA*)
G/A	2 (3.8%)	2 (4.4%)		4 (4.8%)	0 (0.0%)	
A/A	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	
<i>TNF-α -308G>A</i>						
G/G	39 (73.6%)	35 (77.8%)	1.01 (0.45-2.29)	61 (72.6%)	13 (92.9%)	0.22 (0.03-1.81)
G/A	14 (26.4%)	8 (17.8%)		21 (25.0%)	1 (7.1%)	
A/A	0 (0.0%)	2 (4.4%)		2 (2.4%)	0 (0.0%)	
<i>TNF-β 252G>A</i>						
G/G	30 (56.6%)	28 (62.2%)	1.10 (0.55-2.21)	49 (58.3%)	9 (64.3%)	0.61 (0.26-1.42)
G/A	23 (43.4%)	13 (28.9%)		32 (38.1%)	4 (28.6%)	
A/A	0 (0.0%)	4 (8.9%)		3 (3.6%)	1 (7.1%)	
Генотипска група						
Доминантни модел						
<i>TNF-α -238G>A</i>						
G/A + A/A	2 (3.8%)	2 (4.4%)	0.84 (0.11-6.24)	4 (4.8%)	0 (0.0%)	0.00 (0.00-NA*)
<i>TNF-α -308G>A</i>						
G/A+A/A	14 (26.4%)	10 (22.2%)	1.26 (0.50-3.19)	23 (27.4%)	1 (7.1%)	0.20 (0.03-1.65)
<i>TNF-β 252G>A</i>						
G/A+A/A	23 (43.4%)	17 (37.8%)	1.26 (0.56-2.84)	35 (41.7%)	5 (35.7%)	0.78 (0.24-2.52)
Рецесивни модел						
<i>TNF-α -238G>A</i>						
G/G+G/A	53 (100.0%)	45 (100.0%)	NA	84 (100.0%)	14 (100.0%)	NA
<i>TNF-α -308G>A</i>						
G/G+G/A	53 (100.0%)	43 (95.6%)	0.00 (0.00-NA*)	82 (97.6%)	14 (100.0%)	0.00 (0.00-NA*)
<i>TNF-β 252G>A</i>						
G/G+G/A	53 (100.0%)	41 (91.1%)	0.00 (0.00-NA*)	81 (96.4%)	13 (92.9%)	2.08(0.20-21.51)

OR – Odds Ratio; 95% CI – 95% интервал поверења за процењени OR, NA – није применљиво, NA*-није доступно

Табела 8. Мултиплом логистичком регресијом добијен преглед утицаја различитих варијабли на морталитет код акутног панкреатитиса, засновано на доминантном *TNF* генетском моделу

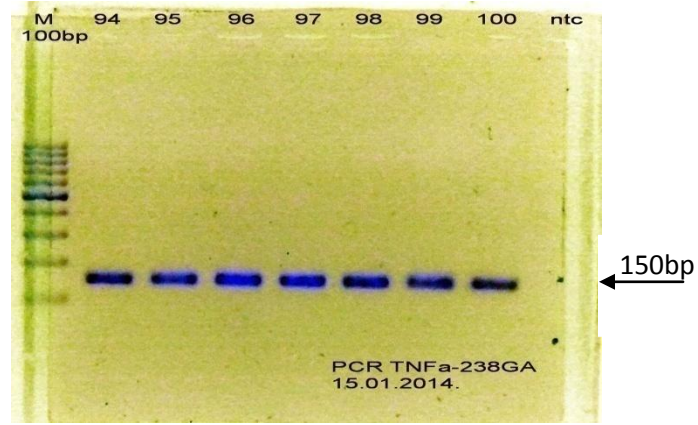
Варијабле	β	SE	Wald χ^2	p	OR	95% CI
Пол	0.557	0.685	0.661	0.416	1.745	0.456 - 6.676
Charlson-ов индекс коморбидитета	0.629	0.379	2.761	0.097	1.876	0.893 - 3.941
<i>TNF-α</i> -238G>A*	- 19.605	19,573.391	0.000	0.999	0.000	0.000 - NA
<i>TNF-β</i> 252G>A*	0.679	0.733	0.856	0.355	1.971	0.468 – 8.298
Године x <i>TNF-α</i> -308G>A**	0.046	0.018	6.590	0.010	1.047	1.011 – 1.084
Константа	-5.330	1.408	14.335	0.000	0.005	

β – регресиони коефицијент; SE – стандардна грешка регресионог коефицијента; Wald χ^2 – Wald-ов тест за DF=1; p – вредност вероватноће; OR – Odds Ratio (однос шанси); 95% CI – 95% интервал поверења за процењени OR

* носиоци G/G генотипа као референтна категорија,

** носиоци -308A генотипа као референтна категорија

На слици 12 је приказан пример амплификованих PCR продуката полиморфизма *TNF- α* -238G>A дужине 150bp.



Слика 12. Пример амплификованих PCR продуката полиморфизма *TNF- α* -238G>A (rs361525). Колона М : 100bp ДНК маркер; колона ntc (non template control – контрола без узорка); колоне 94-100: PCR продукти

5. ДИСКУСИЈА

Овом студијом је утврђивана повезаност различитих фактора са тежином клиничке слике акутног панкреатитиса. Испитан је утицај одређених варијација гена који кодирају панкреасне протеине и факторе некрозе тумора, али и утицај етиолошких фактора болести, старости, пола, пропратних хроничних болести, пушења и алкохола.

Постоје студије које су се бавиле истраживањем полиморфизама *PRSSI* и *SPINK1*, а који су од значаја за генетско тестирање када се ради о панкреатитису (212). До сада није било ни једне публиковане студије која се бавила испитивањем функционалних полиморфизама *PRSSI* и *SPINK1* код пацијената лечених због акутног панкреатитиса у српској популацији. Ово је прва таква студија у српској популацији. Због одсуства или врло ниске учесталости јављања испитиваних варијација, утицај ових полиморфизама на тежину клиничке слике акутног панкреатитиса није могао бити процењен.

Испитивањем функционалних полиморфизама *CFTR* гена се дошло до резултата, које, колико је нама познато, није објавила ни једна досадашња студија. Добијени резултати указују да је ризик више него двоструко већи код жена оболелих од акутног панкреатитиса, да развију тешку форму болести, уколико су носиоци бар једног *CFTR* IVS8 9T алела. Исто тако, примећена је повезаност тешког облика болести са претходно присутним коморбидитетима.

Такође, ово је прва студија којом је утврђено да пацијенти носиоци бар једног *TNF- α -308A* алела имају скоро десет пута мањи ризик за смртни исход због акутног панкреатитиса.

5.1. *PRSSI* ген

PRSSI као најчесталија изоформа трипсиногена, доводи се у везу са херeditарним панкреатитисом почевши од краја прошлог века (92, 114, 120) (378). Наиме, катјонском трипсиногену се приписује кључна улога у патогенези херeditарног панкреатитиса, а подразумева да је за почетак панкреатитиса неопходна интрапанкреатична активација трипсиногена (101). С обзиром да је *PRSSI* неактивна прекурсорска форма ензима трипсина, активира се отцепљивањем TAP-а (379) дејством ентерокиназе или другог молекула трипсина (32). О значају нивоа активног трипсина неопходног за развој акутног панкреатитиса и његовој кључној улози у аутодигестији панкреаса, говори студија којом се објашњава ефикасност инхибитора трипсина габексата у превенцији акутног панкреатитиса узрокованог ендоскопском ретроградном холангиопанкреатографијом (380). Ниво активног трипсина је регулисан на различите начине, али најпре балансирањем његовог стварања и хидролизе (117). Очигледно да акутни и херeditарни хронични панкреатитис имају заједничку тачку, а то је неопходна активност трипсина за почетак болести (378).

Прве варијације *PRSSI* гена које су повезане са настанком херeditарног панкреатитиса су 365G>A и 86A>T (92, 120). Оне утичу на ниво активности трипсина изазивајући исти ефекат – инхибирана аутолиза трипсина, па услед тога имамо повишен ниво активног трипсина доступног за активацију проензима панкреаса и аутодигестију.

Осим што разлика између ова два полиморфизма постоји на клиничкој основи тј. у односу на животно доба појаве панкреатитиса и тежину болести (95, 122), разлике постоје и у механизму којим доводе до повећане активности трипсина.

Полиморфизам 365G>A доводи до замене аргинина (R) хистидином (H) у бочном пептидном ланцу у регији кодона 122 молекула трипсиногена (R122H) (92). Заменом аминокиселина поменути полиморфизам доводи до губитка нормално присутног места за аутолизу (R122), тј. места где се трипсину-сличним молекулима инактивира трипсин (116, 381-385), чини га стабилним (116, 381), и тако подиже његов ниво који омогућава настанак акутног панкреатитиса (84). Због своје аутолитичке стабилности, R122H-трипсин се често назива „супертрипсин“. Дакле, код R122H варијације се не дешава инактивација трипсина услед недостатка места за аутолизу, те је услед сталне активности доступан за

покретање аутодигестије панкреаса претходно описаним механизмима (101, 102). Према томе, R122H варијација, осим што инхибира аутокаталитичку инактивацију трипсина (116), код херeditарног панкреатитиса појачава аутоактивацију катјонског трипсиногена (116), али доводи и до стабилизације зимогена (383).

Полиморфизам 86A>T нешто другачијим механизмом се доводи у везу са херeditарним панкреатитисом, али има анти-аутолитички ефекат као и R122H. У овом случају поларна аминокиселина аспарагин (N) у бочном пептидном ланцу у регији кодона 29 се замењује хидрофобном аминокиселином изолеуцином (I), па отуда у номенклатури N29I (120). Јапанском студијом (122) утврђено је да поменути полиморфизам не доводи до нестанка места за аутолизу као што је случај код R122H, већ чини трипсин резистентним на инактивацију променом конформационе структуре молекула, тј. заклањањем R122 позиције у петљи за аутолизу, због чега тако недоступан R122 не омогућава аутолизу, па долази до накупљања у вишку активног трипсина (101, 102, 140). Пре њих су и Gorry et al. (120) претпоставили да нека врста конформационе промене може смањити инактивацију трипсина.

Херeditарни панкреатитис, као облик хроничног панкреатитиса који се јавља код две или више особа у две или више генерација и наслеђује се аутозомно доминантно, започиње обично у детињству акутним запаљењем панкреаса. Наредним рецидивирајућим атацима ово обољење прогредира кроз некроза-фиброза секвенцу из акутног облика у хроничну форму (83, 102, 140, 378, 386). Отприлике 10-30% пацијената са идиопатским акутним панкреатитисом прогредира ка хроничном панкреатитису из непознатих разлога (387). Са друге стране, показано је да већина пацијената са генетском предиспозицијом развија акутни панкреатитис у детињству, а преко рецидивирајућих панкреатитиса (обично 3 или више) у неким случајевима прогредира у хронични панкреатитис (50, 388, 389). С обзиром да савремени концепт патофизиологије панкреатитиса посматра акутни панкреатитис као догађај, а хронични панкреатитис као процес (32), може се рећи да сви типови панкреатитиса представљају једну исту болест у различитим стадијумима (49, 50, 83, 84, 184, 386). Присуство генских мутација код акутног и акутног рецидивирајућег панкреатитиса повећава ризик за настанак хроничног панкреатитиса (67% са мутацијама наспрам 17% без мутација) (390). На основу овога, разумљиво је очекивати да ове варијације гена могу допринети истим или сличним особинама, развоју и тежини

клиничке слике, како код херeditарног, тако и код спорадичног облика акутног панкреатитиса. Ове две варијације су идентификоване у породицама са херeditарним панкреатитисом у више земаља, и то у Француској (391), Немачкој (392, 393), Великој Британији (123, 394), САД (395, 396) и Јапану (122). Код херeditарног панкреатитиса широм света су обе заступљене са укупном учесталашћу од 90%, од чега R122H варијација у око 65%, а N29I у око 25% случајева (86, 117). Интересантно је да се ове варијације налазе код свега 0-1% пацијената оболелих од хроничног панкреатитиса, а који су без породичне анамнезе (84). У таквим случајевима улоге *PRSSI* 365G>A и 86A>T варијација су мало разумљиве. Уз то, варијабилне фреквенције *PRSSI* варијација су утврђене у етнички различитим популацијама (126, 140, 146, 376, 397-404). У нашој студији, у српској популацији оболелој од акутног панкреатитиса, није идентификован ни један носилац 365G>A или 86A>T варијација. Ово одговара претходно добијеним подацима у групи пацијената са спорадичним формама панкреатитиса (83, 124, 146, 150, 153, 376, 386, 400, 401, 404), што указује на то да се код српске популације процена настанка акутног панкреатитиса и процена тежине развијене болести, не може заснивати на генетском тестирању *PRSS1* (50). С обзиром на комплексност развоја акутног панкреатитиса и мултифакторијални учинак бројних генетских и негенетских фактора ризика који одређују ток болести, врло је могуће да тежина ове болести код Срба зависи од неких других генетских фактора и модификујућих фактора, као и фактора околине.

5.2. *SPINK1* ген

SPINK1, као инактивациони фактор интрапанкреатичне активности трипсина, поседује реактивно место које служи као супстрат за трипсин (93). Ово реактивно место је представљено лизином у позицији 41 и изолеуцином у позицији 42, -Lys⁴¹-Phe⁴²- (133). Он директно инхибира трипсин везивањем за каталитичко активно место трипсина (140), и том приликом се ствара ковалентна веза која доприноси настанку релативно стабилног комплекса *SPINK1*-трипсин (55, 140, 405-408). Познато је да инкубација у једнаким количинама трипсина и *SPINK1* за мање од 3 минута доводи до стварања ковалентне везе између каталитичког серина у активном месту трипсина и карбоксилне групе лизина у реактивном месту *SPINK1* (96). Прецизно „фитовање“ лизина у специфичном одређеном „цепу“ активног места трипсина закључава конформациони распоред главног пептидног ланца у активном месту трипсина, што је неопходно за нормалну функцију инхибиције (140).

Једна од најбоље описаних *SPINK1* варијација, за коју се показало да је удружена са панкреатитисом, је 101A>G (93, 405). То је тзв. N34S варијација, јер променом аденина у гуанин у екзону 3 *SPINK1* гена, аспарагин (N) у кодону 34 у близини реактивног места *SPINK1* (Lys41) се супституише серином (S) (405), што доводи до структуралне промене протеина и губитка његове функције (140). Више студија је показало присуство варијација *PRSSI* гена код херeditарног (92, 120, 391) и идиопатског хроничног панкреатитиса (393), мада већина пацијената са овим типом панкреатитиса нема ове мутације (393). N34S варијација је и откривена баш код фамилијарног облика панкреатитиса без присуства *PRSSI* варијација (93). У тој студији (93) је од 96 пацијената са хроничним панкреатитисом, 101A>G варијација идентификована код 18 њих (18,7%), и то 6 хомозигота (чији су родитељи били хетерозиготи за 101A>G варијацију) и 12 хетерозигота, у обе групе са истим фенотипским карактеристикама. Тако је N34S варијација доведена у везу са хроничним панкреатитисом (93). С обзиром да патофизиолошки механизам указује на то да до инфламације панкреаса долази због повећане активности трипсина (до које доводе поменуте *PRSSI* варијације) или због смањене инхибиције трипсина (губитком инхибиторне функције *SPINK1*) (93), у овом случају је јасно да у одсуству *PRSSI* варијација, механизам настанка панкреатитиса је

заправо смањена функција инхибитора трипсина. Пошто генске варијације доводе до структуралних промена кодираног протеина и тако утичу на његову функцију, то објашњава зашто се N34S варијација доводи у везу са губитком функције SPINK1 (140). N34S варијација узрокује конформационе промене главног пептидног ланца SPINK1 на месту где се инхибитор везује за супстрат (140). Тако промењена интеракција са трипсином доводи до стварања слабије везе, па самим тим и смањења инхибиторне функције (140). Кроз бројне студије је N34S варијацији приписивана бар делом одговорност за инфламацију панкреаса, с обзиром да активност трипсина може бити инхибирана помоћу SPINK1 (405). Ипак, истраживања су износила контрадикторне резултате (144): док су неке студије утврдиле да нема повезаности између ове варијације и ризика за болест или тежине болести (33, 124, 405, 409), други су утврдили да је N34S варијација било узрок (93, 150) или кофактор (54, 140, 146, 153, 386, 401, 410) у развоју болести. Оно што је свакако јасно, то је да gain-of-function (trypsin) варијације тј. горе поменуте две варијације PRSS1, доводе до повећане активности трипсина, који у процесу заштите од настанка панкреатитиса троши SPINK1, а то логично смањује његову количину у панкреасу (102). Може се рећи да gain-of-function варијације у PRSS1 гену или loss-of-(trypsin inhibitor)-function варијације у SPINK1 гену имају сличан утицај на ниво активности SPINK1 (102). Управо зато, ефекат који даје SPINK1 мутација зависи од количине слободног SPINK1 који се није везао за трипсин; тако да хомозиготни носиоци N34S варијације са већом количином нефункционалног SPINK1 могу развити панкреатитис, али у хетерозиготном стању није довољна N34S варијација, већ је потребно додатно деловање егзогених и ендогених фактора да би се болест развила (411); пример је 518T>C варијација CASR гена (енгл. calcium sensing receptor gene) који кодира CaSR протеин (412), као предиспонирајућег фактора за настанак панкреатитиса код особа са N34S варијацијом у хетерозиготном стању (413).

Према нашим добијеним резултатима, међу пацијентима оболелим од акутног панкреатитиса, само један је био носилац N34S варијације. Према претходно публикованим подацима за случајеве спорадичних идиопатских панкреатитиса у различитим демографским подручјима, опсег учесталости у различитим популацијама је широк. Тако су учесталости N34S варијације код Бразилаца (124), Кинеза (126), Јапанаца (150, 414), Француза (399, 404, 405), Немаца (93, 415), Италијана (54, 400), Румуна (416),

Британаца (409), Шпанаца (376), Данаца (402), Американаца (140), Пољака (403) и Индијца (401), редом 0,0%; 0,0%; 0,0-3,1%; 0,0-10,3%; 0,5-23%; 2,7-9,4%; 5%; 18%; 18,8%; 19,5%; 25%; 28,6% и 32,5%. Наш резултат показује учесталост која се налази у почетном делу поменутог опсега. Разлог за овакву разлику у учесталости међу популацијама може бити разноврсност пацијената укључених у наведене студије тј. пацијенти који су укључени у студије имају различите облике панкреатитиса и различите узрочнике болести (399, 417). Ипак, патогенеза панкреатитиса је код свих типова иста и започиње превременом активацијом трипсиногена и неинхибираном активношћу трипсина (49, 50, 83, 84, 184, 386). Према томе, вероватније је да разлика у поменутим учесталостима показује интеретничку варијабилност N34S варијације (126, 403), која би могла да објасни раније супротне налазе у развоју панкреатитиса и његовој клиничкој слици. Пацијент из наше студије је имао тешку клиничку слику. Међутим, он је имао прекомерну телесну масу, користио је алкохол и имао је калкулозу жучне кесе, што су све фактори ризика (55, 121). С обзиром да је пацијент старији и да претходно током живота није имао нападе акутног панкреатитиса тј. да није имао наследни облик болести који би се много пре испољио, вероватно да је N34S варијација снизила праг за настанак панкреатитиса који су изазвали други узрочници тј. ова варијација је испољила особину модификатора болести вероватно узрокујући тежу клиничку слику. Без обзира на ово, врло ниска учесталост ове варијације у нашој студији нас онемогућава да изведемо било какав закључак у смислу повезаности са настанком акутног панкреатитиса и тежином клиничке слике код већ развијене болести. За сада у свету нема индикација за рутинску генотипизацију с циљем скрининга и дијагностиковања или промену терапије пацијената оболелих од панкреатитиса (212). Наша студија такође не подржава рутинску генотипизацију спорадичних случајева акутног панкреатитиса код Срба.

5.3. *CFTR* ген

Овом студијом је утврђено да је ризик за развој тешке форме болести код женске популације 2,115 пута већи ако су оне носиоци бар једног *CFTR* IVS8 9T алела. Наведено није потврђено и код мушке популације. Исто тако, приметили смо повезаност тешког облика болести са претходно присутним коморбидитетима; тачније, постоји позитивна корелација ССИ скор са тежином акутног панкреатитиса. Ниједан од добијених резултата, колико је нама познато, до сада није објавила ни једна студија. Има публикованих резултата који повезују ССИ скор са ризиком за настанак акутног панкреатитиса код дијабетичара типа 2 (418) или оних који су на хемодијализи (419), затим са дужином боравка у хоспиталним условима када је у питању лака форма акутног панкреатитиса (420), као и са развојем органске инсуфицијенције и повећања морталитета код акутног панкреатитиса, али не и локалних компликација (421). Међутим, нема студија које доводе у везу ССИ скор са тежином болести. Такође, иако има студија које доводе у везу варијацију IVS8 poly-T са настанком акутног панкреатитиса (422), наша студија је прва показала повезаност овог полиморфизма са тежином клиничке слике овог обољења.

Пошто у нашу студију нису укључени здрави испитаници, није било могуће проценити утицај испитиваних фактора на преваленцу акутног панкреатитиса. Међутим, уочили смо другачију дистрибуцију учесталости IVS8-poly T алела код пацијената са акутним панкреатитисом у српској популацији у односу на здраву испитану популацију Срба (423), што имплицира на могућност повезаности ове варијације са настанком акутног панкреатитиса.

Учесталост генских варијација, дакле, може варирати и у здравој и у популацији са одређеним патолошким стањем, све у зависности која се популација испитује. Тако је код здравих општа учесталост 5T алела 4,5% (424), а у популацији Срба 1% (423). Наши резултати показују учесталост 4% код пацијената са акутним панкреатитисом у српској популацији. Повећана учесталост одређеног алела може се довести у везу са настанком одређене болести. Тако је нпр. учесталост IVS8 5T алела код CBAVD (урођени обострани недостатак семевода енгл. Congenital bilateral absence of vas deferens) у општој популацији 25% (425), код астматичара и пацијената са хроничним панкреатитисом у северној Индији редом 42% и 14% (426), код пацијената са хроничним панкреатитисом у Јапану учесталост

IVS8 poly-T варијације језа 5T 4,3%, за 7T 89,4%, а за 9T 6,4% (427). *CFTR* мутације се често јављају као заједничка карактеристика патолошких стања (CBAVD, астма, хронични панкреатитис) која се срећу код цистичне фиброзе (426). Тако нпр. више студија (428-430) је довело у везу *CFTR* IVS8 5T алел са астмом, мада има и опречних студија (431-433) којима се показује да поменута варијација и астма нису повезане. Када је у питању повезаност *CFTR* IVS8 5T алела са хроничним панкреатитисом, резултати су такође контрадикторни. Постоје студије које показују позитивну корелацију *CFTR* IVS8 5T алела са хроничним панкреатитисом (434, 435), и такође оне које указују да те повезаности нема (399, 436). *CFTR* IVS8-5T алел се такође доводи у везу са настанком CBAVD (227, 425, 437) и показује интеретничку варијабилност заступљености варијације код ове болести, па је она у Турској, Ирану, Португалији и Тајвану редом 19,6% (438), 25,94% (439), 27,4% (440) и 44,4% (441). Према томе, заједничка карактеристика овим болестима је присуство *CFTR* IVS8-5T алела који доводи до дисфункције *CFTR* канала (218, 228-230, 442). С обзиром да функционалан *CFTR* канал превенира настанак акутног панкреатитиса смањењем киселе средине у панкреасу лучењем бикарбоната и повећањем волумена панкреасног сока ради испирања панкреасних ензима у дуоденум (30, 443), *CFTR* IVS8-5T алел се доводи у везу са акутним панкреатитисом (422). Интеретничка варијабилност *CFTR* IVS8-5T алела (423, 424, 438-441), уз повезаност са акутним панкреатитисом (422), упућује на потребу за испитивањем заступљености и утицаја ове варијације на настанак различитих болести у српској популацији, па и акутног панкреатитиса.

У егзону 10 *CFTR* гена је лоциран М470V полиморфизам који кодирањем дела првог NBD-а *CFTR* протеина утиче на функцију *CFTR* (218-220). Иако је показано да М470 алел повећаним бројем *CFTR* канала и/или већом вероватноћом да канал буде отворен, омогућава повећану функцију *CFTR* канала (218), ипак се М470V полиморфизам не доводи у директну везу са настанком болести. Синергистичким ефектом у оквиру хаплотипа у комбинацији са другим полиморфизмима као што су (TG)_m и Tn, М470V полиморфизам се може довести у везу са настанком одређених клиничких стања (221-223). Учесталост М470 алела у здравој српској популацији је 45%, а V470 55% (423), што се разликује од других јужноевропских популација где је учесталост V470 63,9% (424). У нашој студији, М470V полиморфизам је нађен код 43 пацијента са лаком формом болести

(43/53) и код 35 пацијената са тешком формом болести (35/45), али није показао повезаност са настанком акутног панкреатитиса.

R117H варијација доводи до смањене спроводљивости CFTR канала (213) и тако представља генетску основу за равој више болести, укључујући CBAVD, цистичну фиброзу, хронични панкреатитис и астму (426, 427, 444). Учесталост ове варијације је различита код исте болести у односу на географско подручје које се испитује. Тако је нпр. учесталост ове варијације код хроничног панкреатитиса у северноиндијској популацији 4% (426), а код пацијената оболелих од исте болести у Јапану није утврђено присуство варијације (427). Исто тако, R117H варијација је заступљена код астматичара у северноиндијској популацији са 2% (426), док у Азији није утврђено присуство ове варијације код пацијената оболелих од хроничне болести плућа (430). С обзиром на хипофункцију CFTR канала до које доводи R117H варијација (213, 216) и значај смањене спроводљивости CFTR канала на патогенезу акутног панкреатитиса (30, 443), а имајући у виду и претходно поменуто интернетничку варијабилност учесталости ове варијације код одређених патолошких стања (426, 427, 430), у нашој студији у српској популацији испитивана је учесталост поменуте варијације, али ниједан од пацијената са акутним панкреатитисом није био носилац R117H варијације.

Секреција бикарбоната стимулирана ниским концентрацијама жучних киселина делује протективно на панкреас штитећи га од жучи, док инхибиција секреције бикарбоната високим концентрацијама жучних киселина може допринети развоју акутног панкреатитиса (445). Дакле, за одржање хомеостазе у панкреасу је важно лучење бикарбоната, у супротном, ацидификација панкреасног сока проузрокује настанак акутног панкреатитиса (186, 446).

Такође, да би се спречио настанак акутног панкреатитиса, важно је превенирати задржавање ензима у панкреасу и превремену активацију панкреасних ензима унутар жлезде. То се постиже испирањем ензима из канала панкреаса и њиховим физичким премештањем у лумен дуоденума, где се иначе нормално активирају ради дигестије хранљивих материја. Испирање канала панкреаса је ефикасније уколико је волумен панкреасног сока увећан. Да би се иначе мала количина егзокрине секреције повећала, панкреас лучи воду у лумен канала и на тај начин повећава волумен панкреасног сока. Зато је потребно да секреција бикарбоната кроз CFTR канал на луменској страни

епителних ћелија панкреасних канала тече неометано, како би бикарбонати за собом повукли воду у лумен канала (30).

Због претходно описаних механизма за превенцију настанка панкреатитиса, у смислу алкализације панкреасног сока лучењем бикарбоната и испирањем ензима повећањем волумена панкреасног сока, очувана функција CFTR канала је врло важна (30, 443).

Укратко, најприхваћенији молекуларни модел "gating"-а CFTR канала подразумева да везивање АТФ-а узрокује димеризацију NBD-а, што ствара конформационе промене MSD-а и отварање канала (168, 170, 447, 448). Хидролизом АТФ-а ензимском активношћу NBD-а се ослобађа ADP и завршава се циклус активности CFTR канала. Димеризација NBD-а подразумева стварање лабилне форме по моделу глава-реп што омогућава бољи контакт везивног места на NBD са АТФ-ом (160). Отварање и затварање канала захтева везивање АТФ-а за оба NBD-а, с тим што хидролиза АТФ-а на NBD1 нема велики значај, али хидролиза АТФ-а на NBD2 завршава циклус gating-а и затвара канал (449). Једном везани АТФ-а на NBD1 остаје везан више минута на том месту у нехидролизованом форми и споро хидролизује, па исто указује на стабилну форму АТФ-NBD1 (450). Напротив, хидролиза везаног АТФ-а за NBD2 се одиграва исто толико брзо колико и његово везивање. Како се отварање и затварање канала одвија десет пута брже него везивање АТФ за NBD1, то је у највећој мери отварање и затварање канала одређено везивањем АТФ-а за NBD2 (160). Према томе, када се АТФ веже за NBD1, он неколико минута остаје везан у стабилној форми, а за све то време се одигравају циклуси отварање-затварање-отварање (тј. "gating"); везивање АТФ за NBD2 доводи до стварања чврстог хетеродимера NBD1-NBD2 који уводи CFTR канал у стање праска (енгл. burst state) тј. стање брзог еквилибријума у коме постоје две конформације CFTR канала - још увек неотворен канал и стварно отворен канал (160). Релативно стабилно отворено (burst) стање постаје дестабилизовано хидролизом АТФ везаног за NBD2 и ослобађањем неорганског фосфата (P_i) (160). Последица овога је промена стања NBD1- NBD2 димера, ослобађање ADP-а и затварање CFTR канала (160). Молекуларни механизам којим NBD1- NBD2 димер доводи до отварања канала није познат, али се у везу са тим доводе интрацелуларне вијуге ICL1-ICL4 које полазе са MSD-а и интерреагују са NBD димером изазивајући конформационе промене MSD-а (171, 451, 452).

Према описаном моделу функционисања CFTR канала тј. сврхе NBD1 и NBD2 у "gating"-у, јасно је да би до дисфункције CFTR канала могао довести било какав структурални дефект NBD1 или NBD2.

Бројне студије су до сада имале за предмет истраживања интронску варијацију IVS8 poly-T, за коју је показано да бројем тимина у својој секвенци одређује шансу да се догоди делеција егзона 9 CFTR гена, који кодира део NBD1 (228). Шанса да дође до исецања егзона 9 током транскрипције је већа уколико је број тимина мањи (228). Након исецања егзона 9, процесом транслације би се створио структурално некомплетан NBD1, што би се одразило на функцију CFTR канала (218, 229, 230). Више студија је објављено са резултатима који показују да дужа poly-T секвенца доводи до стварања комплетне форме NBD1, што CFTR протеин чини функционалнијим (214, 227, 228, 231, 232). Према томе, неочекивано би било да варијација CFTR IVS8 9T доприноси хипофункцији CFTR.

На исецање егзона 9 у процесу транскрипције CFTR протеина, поред CFTR IVS8–poly T, могу утицати и други генски локуси (218). Shrimpton у својој публикацији из 2000. године (214) описује значај комбинација CFTR R117H варијације са CFTR IVS8-5T и CFTR IVS8-7T, пошто је утврђено да испољавање фенотипа цистичне фиброзе зависи од два хаплотипа: R117H-IVS8-5T и R117H-IVS8-7T (234). R117H у комбинацији са IVS8-5T ствара смањен број CFTR протеина пуне дужине, док у комбинацији са IVS8-7T формира парцијално функционалне CFTR протеине у нормалном броју (198). Зато је R117H-IVS8-5T хаплотип повезан са цистичном фиброзом, док R117H-IVS8-7T хаплотип не даје симптоме цистичне фиброзе (или баш ретко), али даје CBAVD (218). Из тог разлога Shrimpton препоручује да се тестирање IVS8 poly-T и R117H ради увек истовремено, тако да је оправдано узети у разматрање и ефекат који R117H има на интронску варијацију. Међутим, у нашој студији је учесталост R117H варијације 0%, што апсолутно искључује могућност било каквог утицаја на забележени ефекат CFTR IVS8 9T варијације (453).

Показано је да M470V варијација различитим механизмима чини CFTR канал хипофункционалним (218), као и да искључиво синергистичким ефектом са другим генима може проузроковати болести (221-223), а да за сада нема публикација које би показале директни ефекат овог полиморфизма код одређеног клиничког стања. Различите студије показују да M470V и IVS8–poly T варијације остварују удружени ефекат (454).

Резултати наше студије, међутим, нису установили утицај M470V на повезаност IVS8 9T алела са тешким обликом акутног панкреатитиса.

Узевши у обзир досадашња истраживања, сматрамо да постоји неколико могућности које би оправдале парадоксални резултат ове студије.

Наиме, акутни панкреатитис је једно од многобројних клиничких стања код којих се може јавити органска инсуфицијенција. Уз то, органска инсуфицијенција је уведена у Атланта дефиницију код тешког облика акутног панкреатитиса (22). Од свих које се могу јавити, најчешће се јавља респираторна инсуфицијенција, као последица дисфункције плућа услед стварања едема плућа (455). Наравно, то подразумева накупљање вишка течности у плућима, што ремети гасну размену и даје тежу клиничку слику. За секрецију течности у плућима, тј. у субмукозним жлездама дисталних тубула и ацинуса, важна је очувана функција CFTR канала (456). Исто тако, показано је студијом да инхибиција активности CFTR канала превенира појаву хидростатског тј. кардиогеног едема плућа, јер је утврђено да активна епителна секреција хлорида кроз CFTR канал за собом повлачи течност у алвеоле и тако доприноси настанку едема (457). На основу наведеног, закључујемо да би пацијенти који су иначе оболели од акутног панкреатитиса, у присуству функционалног CFTR IVS8 9T алела и очуване функције CFTR канала, могли да развију плућни едем, који би увођењем у респираторну инсуфицијенцију погоршао клиничку слику и утицао на ток акутног панкреатитиса са развојем тешке форме болести. Међутим, овакво објашњење не прави разлику између мушкараца и жена, па није довољно да би се оправдао уочени ефекат CFTR IVS8 9T алела искључиво код особа женског пола.

Са друге стране, јасно је да се одређене болести чешће јављају код мушкараца, друге код жена, као и да оне могу имати различит временски почетак и клинички ток са значајно варијабилним стопама морбидитета и морталитета, у зависности од пола (458). Полне разлике могу бити последица различитих фактора, најпре хормонског утицаја, али и генског полиморфизма, тако да сексуални диморфизам код одређених болести свакако има основу у генетици (459). Узимајући у обзир ова сазнања, све више студија се дизајнира тако да утицај пола буде наведен као део истраживања. Тако су одређене студије показале да се варијација ACE гена који кодира ангиотензин I-конвертујући ензим (енгл. *angiotensin I-converting enzyme*, ACE) јавља само код хипертензивних мушкараца, али не и жена (460). Са друге стране, код жена оболелих од шизофреније, али не и

мушкараца, је утврђено присуство варијације RELN гена (461) одговорног за кодирање Reelin протеина екстрацелуларног матрикса, који припада групи серин протеаза и одговоран је за развој централног нервног система (462). Такође је IVS8–poly T варијација у једној студији узета у разматрање у вези са сексуалним диморфизмом, па је показано да је 5T алел удружен са блажом клиничком сликом код жена са цистичном фиброзом, али не и код мушкараца (463). Иста студија објашњава овакав резултат мањом пенетрантношћу 5T код жена (463). Узевши у обзир резултат ове студије, тешку форму акутног панкреатитиса код пацијенткиња које су носиоци 9T алела бисмо могли објаснити управо мањом пенетрантношћу 5T алела код жена, под којом се подразумева да само одређени проценат особа које су носиоци генетског материјала за развој одређене болести, клинички испољи ту болест (90).

Различити генетски и негенетски фактори могу утицати на полну разлику у пенетрантности гена (459, 464). Од генетских фактора који утичу на полно специфичну експресију гена и пенетрантност, помињу се "cis-acting" елементи (као што су R117H и M470V), затим "trans-acting" елементи, али и епигенетске промене (метилација DNA, модификација хистона итд.) (464). Од негенетских фактора се издвајају фактори околине и хормони.

Фактори околине код акутног панкреатитиса су врло често узрочници обољења представљени етиолошким факторима, и могу допринети различитом клиничком току болести (465). Као најчешћи етиолошки фактори се издвајају калкулоза и алкохол, и ту постоји различита заступљеност према полу. Калкулоза тј. билијарна етиологија је чешће заступљена код жена, а акутни панкреатитис алкохолне етиологије се чешће јавља код мушкараца (466-468). Студије су показале да се код акутног панкреатитиса смрт ацинусних ћелија одвија на различите начине, па тако алкохол изазива некрозу ацинусних ћелија (469, 470), док жучне соли, могу изазвати и апоптозу и некрозу (471). Такође, на који начин ће се догодити ћелијска смрт, у многоме одређује клинички ток акутног панкреатитиса. Према Атланта класификацији (22) некроза дефинише тешку форму болести, па је тако обично лака форма удружена са апоптозом, а тешка са некрозом ацинусне ћелије (469, 472, 473). Узимајући у обзир резултат студије (474) да ацинусне ћелије панкреаса које су удружене са *CFTR* мутацијом тј. дисфункционалним *CFTR*-ом, имају повећану осетљивост на настанак апоптозе, може се очекивати да пацијенткиње са

акутним панкреатитисом, због билијарне етиологије, са потпуно функционалним CFTR тј. CFTR IVS8 9T алелом, пре доживе некрозу ацинусних ћелија, што би значило да имају слоност ка развоју тешке форме болести. Ипак, у нашој студији није утврђена повезаност CFTR IVS8 9T алела и тешке форме болести са билијарном етиологијом

Међутим, када је у питању хормонски утицај на настанак и ток акутног панкреатитиса, свакако се може рећи да се полни хормони, пре свега естрогени, могу довести у везу са акутним панкреатитисом, захваљујући својим ефектима стварања калкулозе и хиперлипидемије (475). Осим тога, утврђено је да естрогени директно могу инхибирати функцију CFTR (476) и довести до смањене секреције бикарбоната, па тако вероватно мењати функцију панкреаса и утицати на настанак и ток акутног панкреатитиса (477). С друге стране, CFTR може стимулирати синтезу естрогена (478). Естрогени се, иначе, синтетишу из андрогена у реакцији катализованој конвертујућим ензимом ароматазом, а под утицајем фоликулостимулирајућег хормона (FSH) (479). Овај ензим је под директним утицајем фоликулостимулирајућег хормона (FSH), који активацијом аденил циклазе везане за мембрану (mAC) доводи до пораста cAMP, што омогућује да путем одређеног сигнала (cAMP-responsive element binding protein, CREB) стимулише транскрипцију ароматазе (478). Међутим, поред описаног пута сигнализације помоћу mAC у процесу регулисања синтезе ароматазе, постоји још једна врста аденил циклазе названа солубилна аденил циклаза (sAC), која је се активира бикарбонатима (480), па њена функција у стимулацији синтезе ароматазе тј. естрогена зависи од функционалности CFTR канала. На тај начин CFTR регулише експресију ароматазе и синтезу естрогена, па уколико је CFTR канал функционалан, синтеза естрогена је стимулирана. Оваквом негативном повратном спрегом између естрогена и CFTR може се објаснити парадоксални резултат добијен у нашој студији. Наиме, пацијенткиње које су носиоци потпуно функционалног IVS8 9T алела би требало да имају веће вредности естрогена, који за узврат инхибирају функцију CFTR у другим органима, у овом случају у панкреасу. Као последица свега, лучење бикарбоната у панкреасу је снижено, што пружа услове за развој тешке форме акутног панкреатитиса.

Пацијенти оболели од акутног панкреатитиса, поред основне патологије могу имати и низ других хроничних обољења, која свакако могу допринети тежој клиничкој слици и повећаном морталитету. Да би се направила процена ризика коморбидитета

самостално присутних или у комбинацији са другим, уведен је тзв. Charlson Comorbidity Index (CCI). CCI се примењује од 1987. године у лонгитудиналним студијама ради процене преживљавања тј. десетогодишњег морталитета пацијената оболелих од хроничних болести (481). Утврђено је различитим студијама да у случају акутног панкреатитиса, присуство коморбидитета доприноси настанку органске инсуфицијенције и отежава опоравак, па тако погоршава клиничку слику и повећава смртност (421, 482).

На исход неке болести не утиче само број коморбидитета, већ и тежина тј. озбиљност самог коморбидитета. Тако је уведен појам Weighted index који представља збир процењених тежина за сваки коморбидитет који пацијент има (481). Коморбидитети су груписани у 4 категорије, где свака категорија носи 1, 2, 3 или 6 поена у зависности од озбиљности болести (481). С обзиром да на исход болести могу утицати и године, и тај фактор је укључен у прорачун CCI, поред Weighted index-а (481). Тако нпр. неко ко има 40 год, приписује му се 0 поена. Свака следећа декада носи 1 поен, па неко ко има 60 година ће са 2 поена допринети CCI, ко има 70 година ће са 3 поена допринети CCI, са 80 – 5 поена, итд. Коначно, CCI се израчунава тако што се сабере Weighted index са поенима приписаним годинама пацијента. Наша студија показује очекивано тј. повезаност CCI са тешком формом акутног панкреатитиса.

5.4. *TNF* гени

Овом студијом смо испитали утицај најчешће проучаваних полиморфизама проинфламаторних медијатора $TNF-\alpha$ и $TNF-\beta$ на тежину клиничке слике акутног панкреатитиса, као и исход болести код 98 пацијената са постављеном дијагнозом акутног панкреатитиса. Велики број студија је проучавао утицај ових полиморфизама на акутни панкреатитис (483), али ово је прва која је изведена на српској популацији с циљем утврђивања утицаја етничке припадности. Такође, колико је нама познато, ово је прва студија којом је утврђена тенденција да носиоци бар једног $TNF-\alpha$ -308A алела имају мањи ризик за смртни исход због акутног панкреатитиса, а нарочито да овај ефекат постаје статистички значајан са већом старошћу пацијента.

5.4.1. $TNF-\alpha$ ген

$TNF-\alpha$ и други проинфламаторни цитокини имају важну улогу у настанку панкреатитиса, али и у даљем току болести, јер активирајући звездасте ћелије панкреаса у току акутног панкреатитиса изазивају фиброзу и омогућавају прогресију акутног у хронични панкреатитис (484). На ниво секреције $TNF-\alpha$, осим стимулуса фактора околине који су окидачи његове секреције, утичу и генетски фактори (485).

Функционални полиморфизми $TNF-\alpha$ -308G>A и $TNF-\alpha$ -238G>A утичу на промену нивоа продукције $TNF-\alpha$ (483). Показано је да присуство аденина на месту гуанина у нуклеотидном ланцу у позицији -308 $TNF-\alpha$ гена доводи до повећане продукције $TNF-\alpha$, јер $TNF-\alpha$ -308A делује на транскрипционом нивоу као снажан активатор транскрипције (334). Утврђено је да са почетком настанка експерименталног панкреатитиса долази до повећане продукције $TNF-\alpha$ у панкреасу, а потом и у системској циркулацији (308, 321, 324). Исто тако, антагонисти $TNF-\alpha$ узрокују смањено стварање проинфламаторних цитокина, чине клиничку слику акутног панкреатитиса лакшом и смањују смртност (322, 323). Ово нас упућује на то да се експресија $TNF-\alpha$ може довести у везу са настанком акутног панкреатитиса код здравих особа и са тежином болести код особа са акутним панкреатитисом (308, 322, 324). То би значило да се ниво $TNF-\alpha$ повећава код пацијената

са акутним панкреатитисом у односу на здраве испитанике, као и да је ниво TNF- α већи код пацијената оболелих од акутног панкреатитиса са тешком формом у односу на лаку. Да ли је то баш тако? МсКау et al. су својом студијом показали да продукција TNF- α од стране моноцита значајно расте код пацијената оболелих од акутног панкреатитиса са системским компликацијама у односу на пацијенте са некомплицованим током болести (317). Међутим, студијом коју су спровели Powell et al (486) је показано да је ниво TNF- α сличан код пацијената оболелих од лаке и тешке форме акутног панкреатитиса, али и да не постоји повезаност секреције TNF- α са *TNF- α -308* генотипом, што сугерише да генетски фактори не утичу на степен лучења TNF- α код пацијената са акутним панкреатитисом. Према овим ауторима, добијени резултат се објашњава деловањем фактора околине који су модулатори секреције TNF- α , а не само генетски фактори (486). Па тако, ефекат који има одређени полиморфизам на секрецију цитокина зависи од интеракција са другим генетским и епигенетским факторима, као и факторима околине (483, 485, 486). Нпр. према публикацији Најеер et al. (330), алели *TNF- α -308A* и *TNF- α -238A* су удружени са повећаним стварањем TNF- α , али зато што су често повезани у оквиру хаплотипа са другим функционалним полиморфизмом (487), нпр. са *TNF- α -376G*. Како је присуство *TNF- α -376G* различито у зависности од етничке припадности, одсуство овог полиморфизма би можда могло да утиче на то да алели *TNF- α -308A* и *TNF- α -238A* не узрокују повећану продукцију TNF- α (330).

Иначе, *TNF- α* полиморфизми се доводе у везу са настанком и исходом различитих запаљенских, инфективних и неопластичних болести (340, 488, 489). Тако нпр. полиморфизам *TNF- α -238G>A* се наводи као важан фактор ризика за манифестацију херeditарног хроничног панкреатитиса (342), али углавном студије не указују на удруженост поменутог полиморфизма са запаљенском болешћу панкреаса (332, 483, 490-495). Повезаност *TNF- α* полиморфизама са настанком запаљењских болести панкреаса није јасна, с обзиром да их неки истраживачи доводе у везу са склоношћу да панкреатитис настане, али и да узрокују тешку форму болести, док постоје и истраживања која дају опречне резултате (490, 496-498). Студија која је процењивала генетски утицај на стварање цитокина у инфламаторном одговору код фаталне менингококне болести, утврдила је да је стварање цитокина под значајним утицајем генетских фактора и да је 60% продукције TNF- α генетски одређена (237). У истој студији (237) утврђено је да

полиморфизми *TNF- α* -308G>A и *TNF- α* -238G>A нису повезани са исходом менингококне болести, и да не могу објаснити индивидуалне разлике у продукцији *TNF- α* , што је у сагласности са публикацијом (336) која је потврдила да *TNF- α* -308G>A не утиче на стварање *TNF- α* . Уз све ово, у студији коју су спровели Powell et al (486), а која је проучавала утицај генских полиморфизама (*TNF- α* -308G>A, *TNF- β* 252G>A) на степен лучења *TNF- α* код пацијената са акутним панкреатитисом, као и утицај на настанак и ток болести, показано је да нема разлике у учесталости испитиваних полиморфизама код пацијената са акутним панкреатитисом укључених у студију у односу на контролну групу здравих испитаника, као и између групе са лаким и тешком формом болести, нити позитивне корелације полиморфизама и нивоа *TNF- α* , што сугерише да генетски фактори не утичу на степен лучења *TNF- α* код пацијената са акутним панкреатитисом, али и да не представљају фактор ризика за настанак болести, нити да предиспонирају на развој тешке форме болести (486). Özhan et al. су својом студијом показали да полиморфизми *TNF- α* -308G>A и *TNF- α* -238G>A нису повезани са настанком акутног панкреатитиса, нити са тежином већ настале болести (332). Такође, у сличној студији (356) је утврђено да се *TNF- α* и његови полиморфизми (укључујући и *TNF- α* -308G>A) не доводе у везу са настанком акутног панкреатитиса, нити са тежином болести. Yang et al су својом мета-анализом (483) обухватили студије које се тичу *TNF- α* -308G>A полиморфизма и ризика за настанак панкреатитиса (53, 332, 342, 486, 492-496, 499-501), *TNF- α* -238G>A полиморфизма и ризика за настанак панкреатитиса (332, 342, 493, 495) и *TNF- α* -308G>A полиморфизма и тежине акутног панкреатитиса (53, 56, 494, 496, 501). Овом мета-анализом је утврђено да полиморфизми *TNF- α* -308G>A и *TNF- α* -238G>A не представљају ризик за развој акутног панкреатитиса, нити одређују тежину клиничке слике акутног панкреатитиса, иако је неким студијама (53, 56, 496) показано да су *TNF- α* полиморфизми удружени са септичним шоком и органском инсуфицијенцијом код тешке форме акутног панкреатитиса. Објашњење за ово лежи у чињеници да је *TNF- α* важан у патогенетском механизму настанка и развоја панкреатитиса, али с обзиром да се ради о мултифакторијелној болести, ефекат *TNF- α* није одлучујући (483, 492).

Надовезујући се на спроведено истраживање мета-анализом од стране Yang et al, треба истаћи да су својим истраживањем Balog et al. (496) показали да *TNF- α* -308G>A не представља фактор ризика за настанак акутног панкреатитиса, с обзиром да нису показали

значајну разлику у учесталости *TNF- α* -308A алела између здравих испитаника и пацијената са акутним панкреатитисом. Међутим, значајно повећана учесталост *TNF- α* -308A алела код пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса у односу на групу са лаком формом болести, као и повећана учесталост *TNF- α* -308G алела у групи са лаком формом болести, јасно указује да је *TNF- α* -308A алел могући фактор ризика за развој тешке клиничке слике уколико је акутни панкреатитис већ настао (496).

Такође, Zhang et al су спровели студију која је испитала утицај полиморфизма *TNF- α* -308G>A на развој и исход тешког облика акутног панкреатитиса (53). Ова студија је показала одређене резултате: 102 пацијента је имало тешку форму акутног панкреатитиса; од њих 32 пацијента (31,3%) су развили септични шок, а 70 пацијената (68,7%) није било у ендотоксичном шоку. Стопа морталитета се показала значајно већом у групи пацијената са септичним шоком (9 пацијената наспрам 3 пацијента). Поредићи учесталости варијантног типа алела *TNF- α* -308A није утврђена значајна разлика између група са тешком и лаком формом болести, као ни између укупног броја оболелих од лаке и тешке форме у односу на здраве испитанике. Ово наводи на закључак студије (53) да полиморфизам *TNF- α* -308 G>A не представља фактор ризика за настанак акутног панкреатитиса, као и да не одређује тежину болести. Али зато је *TNF- α* -308A алел значајно чешћи у групи пацијената са септичним шоком, па је закључак ове студије да алел *TNF- α* -308A носи ризик за септични шок и да тако компликује ток акутног панкреатитиса (53). Притом нема значајне разлике нивоа *TNF- α* у групи пацијената са септичним шоком и без њега, што наводи на закључак да ниво *TNF- α* није предиктор развоја септичног шока код тешке форме акутног панкреатитиса (53). Исто тако, слични нивои *TNF- α* су уочени и код носилаца дивљег типа и код носилаца варијантног типа *TNF- α* -308 G>A пацијената са тешким обликом акутног панкреатитиса, (53). Такође, промене овог типа нису забележене ни након развоја септичног стања (53). Међутим постоје студије са контрадикторним резултатима, које показују да је секреција *TNF- α* израженија када је присутан варијантни тип алела *TNF- α* -308A (502), и да је овај алел јако повезан са настанком септичног шока и са 3,7 пута већим ризиком за смртни исход услед септичног шока (340). Објашњење аутора ове студије (53) за контрадикторне резултате у вези са концентрацијом *TNF- α* у плазми јесте да промена у концентрацији *TNF- α* може бити последица више фактора. Први је да *TNF- α* има кратак полуживот (53, 503-505), па да је

пропуштено узимање одговарајућег узорка у коме би требало очекивати присуство TNF- α . Друго, могуће је да панкреасни ензими отпуштени у циркулацију у току акутног панкреатитиса разлагањем TNF- α доведу до пада његовог нивоа у плазми (53). Даље, посматрајући морталитет код пацијената са септичним шоком у поменутој студији (53), носиоци варијантног типа алела *TNF- α -308A* су имали значајно већи степен смртности у односу на носиоце дивљег типа алела *TNF- α -308G*.

Раном проценом тежине клиничке слике акутног панкреатитиса и одабиром пацијената који захтевају лечење у Јединици интензивног лечења, знатно се смањује степен смртности (485). Из тог разлога, употреба маркера тежине и исхода болести у савременој клиничкој пракси заузима своје место. Као један од њих, TNF- α није баш нашао своје место, јер постоје различити контрадикторни резултати који доводе (312, 317, 506-510) или не доводе (53, 324, 486, 490, 511, 512) ниво TNF- α у корелацију са тежином болести и са исходом. Такву улогу би могли преузети функционални полиморфизми који могу утицати на продукцију TNF- α . Ипак, у нашој студији није показана повезаност *TNF- α -308G>A* полиморфизма са настанком акутног панкреатитиса и утицајем на тежину болести, што се подудара са другим спроведеним истраживањима (483), мада је у истраживању Balog et al. (496) наведено да је *TNF- α -308A* алел могући фактор ризика за развој тешке клиничке слике, уколико је акутни панкреатитис већ настао. На основу горе наведеног је јасно да постоје студије које указују на повезаност полиморфизма са повећаном продукцијом TNF- α (317, 330, 502), али и опречне студије на основу чијих резултата се не изводи закључак да постоји било какав утицај полиморфизма на повећану продукцију TNF- α (53, 336, 486). Пошто генетски утицај на количину продукованог TNF- α износи 60% (237), у комплексном патогенетском механизму акутног панкреатитиса се не може искључити утицај других генетских и епигенетских фактора, као и фактора околине (483, 485, 486). Не треба заборавити ни утицај етничке припадности на ефекат поменутих функционалних полиморфизма (330). Због тога је логично да под утицајем других фактора, утицај *TNF- α -308G>A* полиморфизма на синтезу TNF- α може изостати. Према томе, без обзира што се *TNF- α -308A* доводи у везу са септичним шоком код пацијената са тешком формом акутног панкреатитиса и са већом смртношћу услед септичног шока (53, 340), у нашој студији *TNF- α -308A* алел показује протективни ефекат, иако статистичка значајност није постигнута. Ово би се могло објаснити могућим изостанком пораста нивоа

TNF- α (53, 336, 486), услед регулације синтезе TNF- α на посттранскрипционом нивоу (250), јер је бројним студијама показано да *TNF- α -308G>A* полиморфизам не мора бити у корелацији са порастом нивоа TNF- α (53, 237, 336, 486), а колико је нама познато, нема извештаја који би указивао да може бити у инверзној корелацији тј. да доводи до смањене секреције TNF- α . Тако се може избећи настанак органске дисфункције која може допринети смртном исходу, а у вези је са продукцијом TNF- α у виталним органима који у току болести могу развити органску дисфункцију (308, 313), а најчешће су у питању плућа и јетра (313), па и срце (513). Показано је да се продукција TNF- α у плућном паренхиму повезује са настанком ARDS у акутном панкреатитису (66).

Поредећи дистрибуције учесталости *TNF- α -308G* алела и *TNF- α -308A* алела, као и генотипа и генотипских група између групе са лаком и тешком формом болести, као и групе преживелих и умрлих, у нашој студији није уочен утицај испитиваних полиморфизама на тежину болести и морталитет код акутног панкреатитиса. Овај резултат је у сагласности са досадашњим изведеним студијама (53, 332, 356, 483, 486). Испитујући утицај осталих фактора (укључујући пол, године, коморбидитете пацијената изражене кроз ССИ, етиологију болести, пушење, употребу NSAID-а) на морталитет код оболелих од акутног панкреатитиса, није уочен значај, осим у случају утицаја година на смртност, где се ризик за смртност увећава 1,08 пута (OR: 1.080, 95% CI: 1.023-1.141). Утицај година на морталитет (514) доводи до чињенице да ефекат *TNF- α -308G>A* полиморфизма у нашем испитаном узорку српске популације буде израженији. Тако да пацијенти са већим бројем година оболели од акутног панкреатитиса имају већи ризик за смртни исход, уколико су хомозиготни носиоци *-308G/G* генотипа.

Када је у питању полиморфизам *TNF- α -238G>A*, у нашем испитаном узорку није утврђена значајна разлика у учесталости *TNF- α -238G* и *TNF- α -238A* алела и њихових генотипа између група пацијената са лаком и тешком формом болести, као и између група преживелих и умрлих пацијената. С обзиром да су Beranek et al. 2003. године констатовали да је *TNF- α -238A* алел повезан са наследним обликом хроничног панкреатитиса у присуству *PRSSI* варијација R122H и N29I, али не и са другим облицима хроничног панкреатитиса, намеће се питање зашто *TNF- α -238A* алел није фактор ризика и за остале облике панкреатитиса (342). Пенетрантност *PRSSI* варијација R122H и N29I је 80% (101), и вероватно да је у присуству *PRSSI* варијација довољан мали додатни фактор

ризика (*TNF- α* -238A алел) да допринесе манифестацији болести (342). Међутим, код других облика хроничног панкреатитиса је комплекснији однос генетских фактора и фактора околине, па *TNF- α* -238A алел није довољан фактор ризика да би се болест манифестовала (342). Пошто акутни и хронични панкреатитис представљају једну исту болест у различитим стадијумима (49, 50, 83, 84, 184, 386), а у нашој студији ниједан пацијент са акутним панкреатитисом није био носилац испитиваних *PRSSI* варијација, *TNF- α* -238A алел није био довољан фактор ризика да би могао да се доведе у везу са ризиком за акутни панкреатитис, што је у сагласности са досадашњим истраживањима (483).

5.4.2. *TNF- β* ген

TNF- β , као и *TNF- α* , амплификује имуни одговор у патогенетском механизму акутног панкреатитиса (356). Има сличне биолошке активности као и *TNF- α* (244) захваљујући ћелијским рецепторима који су заједнички за оба фактора некрозе тумора (346). Због изузетне близине гена који их кодирају, функције су им јако испреплетене и сличне, тако да их је некада много тешко разликовати у патогенетском механизму код различитих болести (343). Нехомологне секвенце *TNF- α* и *TNF- β* гена су присутне у прва 3 егзона и у интронским секвенцама, али с обзиром да је 4. егзон одговоран за кодирање више од 80% *TNF- α* и *TNF- β* протеина, и да ту постоји хомологија два гена, отуда велика сличност у биолошкој активности 2 протеина (352). И не само то, делови оба протеина кодирани нуклеотидима 4. егзона су одговорни за заједничку цитотоксичну активност (352). Слични митогени стимулуси доводе до индукције оба гена (350, 351), али док транскрипција *TNF- α* почиње унутар 2 сата од митогене стимулације, *mRNA* *TNF- β* се не детектује пре 8-ог сата (348). Зато им је кинетика различита, па своје функције *TNF- β* остварује након *TNF- α* (348).

Најзначајнији полиморфизам *TNF- β* гена је *TNF- β 252G>A*, и он може утицати на синтезу и концентрацију *TNF- α* и *TNF- β* протеина у плазми (355, 361). Међутим, и овде има контрадикторних резултата који показују да *TNF- β 252G>A* полиморфизам не утиче на продукцију *TNF- α* (355).

Различите студије су проучавале ризик за настанак акутног панкреатитиса и утицај на тежину болести (53, 486), а неке су испитивале и смртност пацијената (53). Студије спроведена од стране Zhang et al. (53) и Powell et al (486) нису показале удруженост *TNF-β* 252G>A полиморфизма са настанком акутног панкреатитиса, као ни утицај на тежину болести. Zhang et al. су показали да је *TNF-β* 252G>A у јакој вези са настајањем септичног шока код тешке форме акутног панкреатитиса (53). Међутим, није уочена разлика у степену смртности пацијената са септичним шоком између носилаца варијантног и дивљег типа полиморфизма *TNF-β* 252G>A, као ни утицај *TNF-β* 252G>A на продукцију *TNF-α* (53). Овакво запажање је у супротности са студијом коју су извели Stüber et al. 1996. године (327). Они су испитали утицај полиморфизма *TNF-β* 252G>A на концентрацију *TNF-α* и исход код пацијената са тешком сепсом. Закључили су да пацијенти са смртним исходом имају знатно већу учесталост дивљег типа алела *TNF-β* 252A, а да хомозиготни носиоци овог полиморфизма имају већу смртност од хетерозиготних носилаца; уз то хомозиготи *TNF-β* 252A имају повећане концентрације *TNF-α* у циркулацији у односу на хетерозиготне носиоце полиморфизма *TNF-β* 252G>A, што би значило да је код тешке инфекције продукција *TNF-α* под генетским утицајем (327). Међутим, студијом коју су извели Messer et al (355), није пронађена веза између полиморфизма *TNF-β* 252G>A и продукције *TNF-α*, што се поклапа са студијом изведеном од стране Zhang et al. (53). Али је зато *TNF-β* 252G алел јако повезан са повећаним стварањем *TNF-β*, па тако хомозиготни носиоци *TNF-β* 252G алела имају 5 пута већу секрецију *TNF-β* (355). Иначе, *TNF-α*-308A је често у виду хаплотипа повезан са *TNF-β* геном, и то са *TNF-β* 252G алелом (515). Такође је, студијом коју су спровели Powell et al., уочено да се код свих пацијената који су хомозиготни носиоци *TNF-α* -308G, уједно и хомозиготни носиоци *TNF-β* 252A алела, који се доводи у везу са повећаном продукцијом *TNF-α*, али у овој студији пораст секреције *TNF-α* није забележен (486).

Према нашим резултатима, није уочена значајна разлика у учесталости *TNF-β* 252G и *TNF-β* 252A алела, као и њихових генотипа, између групе пацијената са лаким и са тешким обликом болести, као ни између групе преживелих и умрлих пацијената. Дакле, није уочена повезаност полиморфизма *TNF-β* 252G>A са тежином акутног панкреатитиса и смртношћу, што је у сагласности са студијама које су спровели Zhang et al. (53) и Powell et al (486).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата овде приказане студије, која се бавила испитивањем утицаја генског полиморфизма *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR*, *TNF- α* и β на тежину клиничке слике и смртни исход код српских пацијената са акутним панкреатитисом, може се закључити:

- *PRSS1* 86A>T and 365G>A нису заступљене код пацијената у српској популацији, док *SPINK1* 101A>G варијација има врло малу учесталост, због чега повезаност са тежином клиничке слике и смртношћу од акутног панкреатитиса није могла бити показана.
- Код жена оболелих од акутног панкреатитиса, ризик да развију тешку форму болести је више него двоструко већи уколико су носиоци *CFTR* IVS8 9T алела. *CFTR* R117H варијација није пронађена, а утицај M470V на тежину и морталитет болести, као и ефекат на *CFTR* IVS8 poly-T варијацију, није показан.
- Присуство *TNF- α* -308A алела код старијих особа повећава шансу за преживљавање код оболелих од акутног панкреатитиса. Утицај *TNF* генотипа на тежину акутног панкреатитиса није показан.
- У присуству коморбидитета клиничка слика акутног панкреатитиса је тежа.

С обзиром да је ова студија ограничена релативно малим узорком, утицајем других генетских и негенетских фактора, као и да је спроведена само на српској популацији, ради увођења генотипизације у клиничку примену потребно је спровести даља истраживања на већем узорку испитаника у различитим етничким групама, уз испитивање утицаја генетских фактора и фактора околине.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. McClusky DA, 3rd, Skandalakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Harbinger or hermit? Pancreatic anatomy and surgery through the ages--part 3. World journal of surgery. 2002;26(12):1512-24.
2. Daremberg C RE. Oeuvres de Rufus d'Éphèse. Paris, France: L'Imprimerie Nationale; 1879.
3. Howard JM HW. History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002.
4. A. V. De Corporis humani fabrica. Basel, Switzerland: Joannes Oporinus. 1543.
5. Howard JM, Hess W, Traverso W. Johann Georg Wirsung (1589-1643) and the pancreatic duct: the prosector of Padua, Italy. Journal of the American College of Surgeons. 1998;187(2):201-11.
6. N. T. Observationum medicarum Editio nova et actua [Medical Observations. New and Enlarged Edition]. Vol Book 4. 2nd ed. Amsterdam, the Netherlands; 1652.
7. JC. B. Experimenta nova circa pancreas. Amsterdam, the Netherlands: Wetstenius; 1683.
8. McClusky DA, 3rd, Skandalakis LJ, Colborn GL, Skandalakis JE. Harbinger or hermit? Pancreatic anatomy and surgery through the ages--part 1. World journal of surgery. 2002;26(9):1175-85.
9. Stern CD. A historical perspective on the discovery of the accessory duct of the pancreas, the ampulla 'of Vater' and pancreas divisum. Gut. 1986;27(2):203-12.
10. Modlin IM KM. The Paradox of the Pancreas: from Wirsung to Whipple. Hanover, Germany: Politzki Print Productions; 2003.
11. K. R. Lehrbuch der pathologischen Anatomie [Textbook of Pathologic Anatomy]. Vol 3. Portal, Vienna, Austria: Brau"muller; 1842.
12. Pannala R, Kidd M, Modlin IM. Acute pancreatitis: a historical perspective. Pancreas. 2009;38(4):355-66.

13. R. O. D'une dispositiona sphincter speciale de l'ouverture du canal choledoque. Arch Ital Biol. 1887;8:317Y322.
14. RH. F. Acute pancreatitis: a consideration of pancreatic hemorrhage, hemorrhagic, suppurative and gangrenous pancreatitis, and of disseminated fat necrosis. Boston Med Surg J. 1889;120:181Y188.
15. RH. F. The symptomatology and diagnosis of diseases of the pancreas. Proc N Y Path Soc. 1898;43:1Y26.
16. H. C. Ueber die Selbstverdauung des menschlichen.
17. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. The Journal of physiology. 1902;28(5):325-53.
18. G. G-T. Local discoloration of abdominal wall as a sign of acute pancreatitis. Br J Surg. 1920;7:394Y395.
19. Elman R A, Graham EA. . Value of blood amylase estimations in the diagnosis of pancreatic disease: a clinical study. Arch Surg. 1929;19:943-967.
20. Cherry LS CJ. Specificity of pancreatic lipase: its appearance in blood after pancreatic injury. Am J Physiol. 1932; 100:266.
21. MW. C. Serum lipase: its diagnostic value. Proc Staff Meeting Mayo Clin. 1935;10(810).
22. Bradley EL, 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960). 1993;128(5):586-90.
23. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. Gut. 2013;62(1):102-11.
24. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Localio SA. Objective early identification of severe acute pancreatitis. The American journal of gastroenterology. 1974;61(6):443-51.

25. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1974;139(1):69-81.
26. Balthazar EJ, Ranson JH, Naidich DP, Megibow AJ, Caccavale R, Cooper MM. Acute pancreatitis: prognostic value of CT. *Radiology*. 1985;156(3):767-72.
27. Skandalakis JE GS, Rowe JS Jr. . *Anatomical Complications in General Surgery*. New York: Mc Graw-Hill, 1983.
28. Brunicaardi FC, et al. . *Schwartz's Principles of Surgery*. Tenth edition. New York: McGraw-Hill Education. 2015:1351.
29. Andersen DK BC. Pancreatic anatomy and physiology. In: Greenfield LJ. *Surgery: Scientific Principles and Practice* (2nd ed). Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997, pp. 857-874.
30. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiological reviews*. 2012;92(1):39-74.
31. LaRusch J, Solomon S, Whitcomb DC. Pancreatitis Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
32. Grigorescu M, Grigorescu MD. Genetic factors in pancreatitis. *Romanian journal of gastroenterology*. 2005;14(1):53-61.
33. Cavestro GM, Zuppardo RA, Bertolini S, Sereni G, Frulloni L, Okolicsanyi S, et al. Connections between genetics and clinical data: Role of MCP-1, CFTR, and SPINK-1 in the setting of acute, acute recurrent, and chronic pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(1):199-206.
34. Testoni PA. Acute recurrent pancreatitis: Etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(45):16891-901.
35. Mariani A, Testoni PA. Is acute recurrent pancreatitis a chronic disease? *World journal of gastroenterology*. 2008;14(7):995-8.
36. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2002;56(6 Suppl):S226-30.

37. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet* (London, England). 2015;386(9988):85-96.
38. Hazra N, Gulliford M. Evaluating pancreatitis in primary care: a population-based cohort study. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*. 2014;64(622):e295-301.
39. Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1179-87.e1-3.
40. Akhtar AJ, Shaheen M. Extrapancreatic manifestations of acute pancreatitis in African-American and Hispanic patients. *Pancreas*. 2004;29(4):291-7.
41. Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 2002;89(3):298-302.
42. Petrov MS, Windsor JA. Classification of the severity of acute pancreatitis: how many categories make sense? *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(1):74-6.
43. Zaheer A, Singh VK, Qureshi RO, Fishman EK. The revised Atlanta classification for acute pancreatitis: updates in imaging terminology and guidelines. *Abdominal imaging*. 2013;38(1):125-36.
44. Upchurch E. Local complications of acute pancreatitis. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*. 2014;75(12):698-702.
45. Zhao K, Adam SZ, Keswani RN, Horowitz JM, Miller FH. Acute Pancreatitis: Revised Atlanta Classification and the Role of Cross-Sectional Imaging. *AJR American journal of roentgenology*. 2015;205(1):W32-41.
46. Pintado MC, Trascasa M, Arenillas C, de Zarate YO, Pardo A, Blandino Ortiz A, et al. New Atlanta Classification of acute pancreatitis in intensive care unit: Complications and prognosis. *European journal of internal medicine*. 2016;30:82-7.
47. Forsmark CE, Vege SS, Wilcox CM. Acute Pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 2016;375(20):1972-81.
48. Puolakkainen P, Kylanpaa L. Etiology of acute pancreatitis. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*. 2016;132(19):1773-9.

49. Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1292-302.
50. Whitcomb DC. Value of genetic testing in the management of pancreatitis. *Gut*. 2004;53(11):1710-7.
51. Papachristou GI, Clermont G, Sharma A, Yadav D, Whitcomb DC. Risk and markers of severe acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36(2):277-96, viii.
52. Hofner P, Balog A, Gyulai Z, Farkas G, Rakonczay Z, Takacs T, et al. Polymorphism in the IL-8 gene, but not in the TLR4 gene, increases the severity of acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2006;6(6):542-8.
53. Zhang D, Li J, Jiang ZW, Yu B, Tang X. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 2003;112(2):138-43.
54. Gomez-Lira M, Bonamini D, Castellani C, Unis L, Cavallini G, Assael BM, et al. Mutations in the SPINK1 gene in idiopathic pancreatitis Italian patients. *European journal of human genetics : EJHG*. 2003;11(7):543-6.
55. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. *Annual review of medicine*. 2010;61:413-24.
56. de-Madaria E, Martinez J, Sempere L, Lozano B, Sanchez-Paya J, Uceda F, et al. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas*. 2008;37(3):295-301.
57. Saluja AK, Steer MLP. Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion*. 1999;60 Suppl 1:27-33.
58. Karne S, Gorelick FS. Etiopathogenesis of acute pancreatitis. *The Surgical clinics of North America*. 1999;79(4):699-710.
59. Whitcomb DC. The spectrum of complications of hereditary pancreatitis. Is this a model for future gene therapy? *Gastroenterology clinics of North America*. 1999;28(3):525-41.
60. Gaiser S, Daniluk J, Liu Y, Tsou L, Chu J, Lee W, et al. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. *Gut*. 2011;60(10):1379-88.

61. Itkonen O. Human trypsinogens in the pancreas and in cancer. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2010;70(2):136-43.
62. Szmola R, Sahin-Toth M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(27):11227-32.
63. van Acker GJ, Perides G, Steer ML. Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(13):1985-90.
64. Halangka W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(6):773-81.
65. Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, et al. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *The Journal of surgical research*. 2000;88(2):160-4.
66. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *American journal of surgery*. 1998;175(1):76-83.
67. Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Vina J, et al. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(23):2775-87.
68. Seleznik GM, Zoller J, O'Connor T, Graf R, Heikenwalder M. The role of lymphotoxin signaling in the development of autoimmune pancreatitis and associated secondary extra-pancreatic pathologies. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014;25(2):125-37.
69. Dawra R, Sah RP, Dudeja V, Rishi L, Talukdar R, Garg P, et al. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2210-7.e2.
70. Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280(1):388-95.
71. Dupuis CS, Baptista V, Whalen G, Karam AR, Singh A, Wassef W, et al. Diagnosis and management of acute pancreatitis and its complications. *Gastrointestinal Intervention*. 2013;2(1):36-46.

72. Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(10):2379-400.
73. Kwon RS, Banks PA. How should acute pancreatitis be diagnosed in clinical practice? In: Domínguez-Muñoz JE, ed. *Clinical pancreatology for practicing gastroenterologists and surgeons*. Malden, MA: Blackwell, 2005;4:34-9.
74. Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology*. 1990;174(2):331-6.
75. Larvin M, McMahon MJ. APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis. *Lancet (London, England)*. 1989;2(8656):201-5.
76. Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B. Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *Journal of clinical gastroenterology*. 2002;35(1):50-60.
77. Lankisch PG, Warnecke B, Bruns D, Werner HM, Grossmann F, Struckmann K, et al. The APACHE II score is unreliable to diagnose necrotizing pancreatitis on admission to hospital. *Pancreas*. 2002;24(3):217-22.
78. Halonen KI, Leppaniemi AK, Lundin JE, Puolakkainen PA, Kempainen EA, Haapiainen RK. Predicting fatal outcome in the early phase of severe acute pancreatitis by using novel prognostic models. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2003;3(4):309-15.
79. Stimac D, Fusic E, Milic S, Bilic-Zulle L, Peric R. Prognostic values of IL-6, IL-8, and IL-10 in acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):209-12.
80. Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG, van Leeuwen MS, Horvath KD, Freeny PC, et al. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *The British journal of surgery*. 2008;95(1):6-21.
81. Eckerwall GE, Axelsson JB, Andersson RG. Early nasogastric feeding in predicted severe acute pancreatitis: A clinical, randomized study. *Annals of surgery*. 2006;244(6):959-65; discussion 65-7.
82. Bittner R, Block S, Buchler M, Beger HG. Pancreatic abscess and infected pancreatic necrosis. Different local septic complications in acute pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 1987;32(10):1082-7.

83. Rolston RK, Kant JA. Genetic testing in acute and chronic pancreatitis. *Current gastroenterology reports*. 2001;3(2):115-20.
84. Grendell JH. Genetic factors in pancreatitis. *Current gastroenterology reports*. 2003;5(2):105-9.
85. Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. Genetic background of pancreatitis. *Postgraduate medical journal*. 2006;82(974):775-8.
86. Masamune A. Genetics of pancreatitis: the 2014 update. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2014;232(2):69-77.
87. McEntyre J OJ, editors. . *The NCBI Handbook*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-.
88. Jurinke C, Denissenko MF, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Cantor CR. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation research*. 2005;573(1-2):83-95.
89. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*. 1999;22(3):231-8.
90. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human genetics*. 2013;132(10):1077-130.
91. Cho SM, Shin S, Lee KA. PRSS1, SPINK1, CFTR, and CTRC Pathogenic Variants in Korean Patients With Idiopathic Pancreatitis. *Annals of laboratory medicine*. 2016;36(6):555-60.
92. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature genetics*. 1996;14(2):141-5.
93. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*. 2000;25(2):213-6.
94. Emi M, Nakamura Y, Ogawa M, Yamamoto T, Nishide T, Mori T, et al. Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene*. 1986;41(2-3):305-10.

95. O'Reilly DA, Kingsnorth AN. Hereditary pancreatitis and mutations of the cationic trypsinogen gene. *The British journal of surgery*. 2000;87(6):708-17.
96. Rinderknecht H. Pancreatic secretory enzymes. *The pancreas: biology, pathobiology, and disease*. 1993:219-51.
97. Figarella C, Negri GA, Guy O. The two human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsins derived from their purified zymogens. *European journal of biochemistry*. 1975;53(2):457-63.
98. Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology*. 1981;80(3):461-73.
99. Wiegand U, Corbach S, Minn A, Kang J, Muller-Hill B. Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene*. 1993;136(1-2):167-75.
100. Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. *Biochemistry*. 1978;17(9):1669-75.
101. Whitcomb DC. Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. *The Medical clinics of North America*. 2000;84(3):531-47, vii.
102. Sahin-Toth M. Biochemical models of hereditary pancreatitis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2006;35(2):303-12, ix.
103. Chen JM, Audrezet MP, Mercier B, Quere I, Ferec C. Exclusion of anionic trypsinogen and mesotrypsinogen involvement in hereditary pancreatitis without cationic trypsinogen gene mutations. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1999;34(8):831-2.
104. Idris MM, Bhaskar S, Reddy DN, Mani KR, Rao GV, Singh L, et al. Mutations in anionic trypsinogen gene are not associated with tropical calcific pancreatitis. *Gut*. 2005;54(5):728-9.
105. Nemoda Z, Teich N, Hugenberg C, Sahin-Toth M. Genetic and biochemical characterization of the E32del polymorphism in human mesotrypsinogen. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2005;5(2-3):273-8.
106. Gaboriaud C, Serre L, Guy-Crotte O, Forest E, Fontecilla-Camps JC. Crystal structure of human trypsin 1: unexpected phosphorylation of Tyr151. *Journal of molecular biology*. 1996;259(5):995-1010.

107. Simon P, Weiss FU, Sahin-Toth M, Parry M, Nayler O, Lenfers B, et al. Hereditary pancreatitis caused by a novel PRSS1 mutation (Arg-122 --> Cys) that alters autoactivation and autodegradation of cationic trypsinogen. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):5404-10.
108. Sutton R, Criddle D, Raraty MG, Tepikin A, Neoptolemos JP, Petersen OH. Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2003;3(6):497-505.
109. Colomb E, Figarella C. Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochimica et biophysica acta*. 1979;571(2):343-51.
110. Colomb E, Guy O, Deprez P, Michel R, Figarella C. The two human trypsinogens: catalytic properties of the corresponding trypsins. *Biochimica et biophysica acta*. 1978;525(1):186-93.
111. Rinderknecht H, Renner IG, Carmack C. Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas. *Gut*. 1979;20(10):886-91.
112. Itkonen O, Koivunen E, Hurme M, Alfthan H, Schroder T, Stenman UH. Time-resolved immunofluorometric assays for trypsinogen-1 and 2 in serum reveal preferential elevation of trypsinogen-2 in pancreatitis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1990;115(6):712-8.
113. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science (New York, NY)*. 1996;272(5269):1755-62.
114. Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology*. 1996;110(6):1975-80.
115. Whitcomb DC. New insights into hereditary pancreatitis. *Current gastroenterology reports*. 1999;1(2):154-60.
116. Sahin-Toth M, Toth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;278(2):286-9.

117. Nemeth BC, Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014;306(6):G466-73.
118. Szabo A, Sahin-Toth M. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(24):20701-10.
119. Keim V, Teich N, Mossner J. Trypsinogen mutations in hereditary pancreatitis: which nomenclature is convenient? *Gut*. 2000;46(6):873.
120. Gorry MC, Ghabaizedeh D, Furey W, Gates LK, Jr., Preston RA, Aston CE, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1063-8.
121. Khan AS, Latif SU, Eloubeidi MA. Controversies in the etiologies of acute pancreatitis. *JOP : Journal of the pancreas*. 2010;11(6):545-52.
122. Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, Morita M, Onishi S, Yokoyama K, et al. Mutations in exons 2 and 3 of the cationic trypsinogen gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut*. 1999;44(2):259-63.
123. Creighton JE, Lyall R, Wilson DI, Curtis A, Charnley RM. Mutations of the cationic trypsinogen gene in patients with hereditary pancreatitis. *The British journal of surgery*. 2000;87(2):170-5.
124. Bernardino AL, Guarita DR, Mott CB, Pedroso MR, Machado MC, Laudanna AA, et al. CFTR, PRSS1 and SPINK1 mutations in the development of pancreatitis in Brazilian patients. *JOP : Journal of the pancreas*. 2003;4(5):169-77.
125. Sanchez-Ramirez CA, Flores-Martinez SE, Garcia-Zapien AG, Montero-Cruz SA, Larrosa-Haro A, Sanchez-Corona J. Screening of R122H and N29I mutations in the PRSS1 gene and N34S mutation in the SPINK1 gene in Mexican pediatric patients with acute and recurrent pancreatitis. *Pancreas*. 2012;41(5):707-11.
126. Wang W, Sun XT, Weng XL, Zhou DZ, Sun C, Xia T, et al. Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTSC and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study. *BMJ open*. 2013;3(9):e003150.

127. Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *Journal of the American Chemical Society*. 1948;70(9):3034-40.
128. Bohe M, Borgstrom A, Lindstrom C, Ohlsson K. Pancreatic endoproteases and pancreatic secretory trypsin inhibitor immunoreactivity in human Paneth cells. *Journal of clinical pathology*. 1986;39(7):786-93.
129. Fukayama M, Hayashi Y, Koike M, Ogawa M, Kosaki G. Immunohistochemical localization of pancreatic secretory trypsin inhibitor in fetal and adult pancreatic and extrapancreatic tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1986;34(2):227-35.
130. Paju A, Stenman UH. Biochemistry and clinical role of trypsinogens and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2006;43(2):103-42.
131. Halila H, Huhtala ML, Schroder T, Kiviluoto T, Stenman UH. Pancreatic secretory trypsin inhibitor-like immunoreactivity in pancreatectomized patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985;153(3):209-16.
132. Greene LJ, Pubols MH, Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Methods in enzymology*. 1976;45:813-25.
133. Bartelt DC, Shapanka R, Greene LJ. The primary structure of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Amino acid sequence of the reduced S-aminoethylated protein. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1977;179(1):189-99.
134. Yamamoto T, Nakamura Y, Nishide J, Emi M, Ogawa M, Mori T, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA. *Biochemical and biophysical research communications*. 1985;132(2):605-12.
135. Hecht HJ, Szardenings M, Collins J, Schomburg D. Three-dimensional structure of the complexes between bovine chymotrypsinogen A and two recombinant variants of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal-type). *Journal of molecular biology*. 1991;220(3):711-22.
136. Horii A, Tomita N, Yokouchi H, Doi S, Uda K, Ogawa M, et al. On the cDNA's for two types of rat pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;162(1):151-9.

137. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Digestive diseases and sciences*. 1986;31(3):314-21.
138. Pubols MH, Bartelt DC, Greene LJ. Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *The Journal of biological chemistry*. 1974;249(7):2235-42.
139. Laskowski M, Wu FC. Temporary inhibition of trypsin. *The Journal of biological chemistry*. 1953;204(2):797-805.
140. Pfutzer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, et al. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000;119(3):615-23.
141. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Raguene O, Quere I, Ferec C. Mutations of the pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2001;120(4):1061-4.
142. Bhatia E, Choudhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, et al. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1020-5.
143. Kume K, Masamune A, Mizutamari H, Kaneko K, Kikuta K, Satoh M, et al. Mutations in the serine protease inhibitor Kazal Type 1 (SPINK1) gene in Japanese patients with pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2005;5(4-5):354-60.
144. Aoun E, Chang CC, Greer JB, Papachristou GI, Barmada MM, Whitcomb DC. Pathways to injury in chronic pancreatitis: decoding the role of the high-risk SPINK1 N34S haplotype using meta-analysis. *PloS one*. 2008;3(4):e2003.
145. Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, et al. Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987;149(2):635-41.
146. Drenth JP, te Morsche R, Jansen JB. Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;50(5):687-92.
147. Tukiainen E, Kylanpaa ML, Kempainen E, Nevanlinna H, Paju A, Repo H, et al. Pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene mutations in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2005;30(3):239-42.

148. O'Reilly DA, Witt H, Rahman SH, Schulz HU, Sargen K, Kage A, et al. The SPINK1 N34S variant is associated with acute pancreatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2008;20(8):726-31.
149. Aoun E, Muddana V, Papachristou GI, Whitcomb DC. SPINK1 N34S is strongly associated with recurrent acute pancreatitis but is not a risk factor for the first or sentinel acute pancreatitis event. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(2):446-51.
150. Masamune A, Ariga H, Kume K, Kakuta Y, Satoh K, Satoh A, et al. Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26(6):974-8.
151. Shimosegawa T, Kume K, Masamune A. SPINK1 gene mutations and pancreatitis in Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21 Suppl 3:S47-51.
152. Midha S, Khajuria R, Shastri S, Kabra M, Garg PK. Idiopathic chronic pancreatitis in India: phenotypic characterisation and strong genetic susceptibility due to SPINK1 and CFTR gene mutations. *Gut*. 2010;59(6):800-7.
153. Pelaez-Luna M, Robles-Diaz G, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT. PRSS1 and SPINK1 mutations in idiopathic chronic and recurrent acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(33):11788-92.
154. Moran O. On the structural organization of the intracellular domains of CFTR. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;52:7-14.
155. Marino CR, Matovcik LM, Gorelick FS, Cohn JA. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreas. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(2):712-6.
156. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(1):93-115.
157. McDonagh EM, Clancy JP, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CFTR. *Pharmacogenetics and genomics*. 2015;25(3):149-56.
158. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical biochemistry*. 2012;45(15):1132-44.
159. Kunzelmann K, Mehta A. CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca²⁺. *The FEBS journal*. 2013;280(18):4417-29.

160. Moran O. The gating of the CFTR channel. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2017;74(1):85-92.
161. Wilkinson DJ, Strong TV, Mansoura MK, Wood DL, Smith SS, Collins FS, et al. CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. The American journal of physiology. 1997;273(1 Pt 1):L127-33.
162. Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. The Journal of physiology. 2003;548(Pt 1):39-52.
163. Seavilleklein G, Amer N, Evagelidis A, Chappe F, Irvine T, Hanrahan JW, et al. PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR. American journal of physiology Cell physiology. 2008;295(5):C1366-75.
164. Cai Z, Scott-Ward TS, Sheppard DN. Voltage-dependent gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel. The Journal of general physiology. 2003;122(5):605-20.
165. Winter MC, Welsh MJ. Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. Nature. 1997;389(6648):294-6.
166. Mathews CJ, Tabcharani JA, Chang XB, Jensen TJ, Riordan JR, Hanrahan JW. Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. The Journal of physiology. 1998;508 (Pt 2):365-77.
167. Csanady L, Chan KW, Seto-Young D, Kopsco DC, Nairn AC, Gadsby DC. Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. The Journal of general physiology. 2000;116(3):477-500.
168. Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. Nature. 2005;433(7028):876-80.
169. Mense M, Vergani P, White DM, Altberg G, Nairn AC, Gadsby DC. In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. The EMBO journal. 2006;25(20):4728-39.
170. Muallem D, Vergani P. Review. ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 2009;364(1514):247-55.

171. Mornon JP, Hoffmann B, Jonic S, Lehn P, Callebaut I. Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(7):1377-403.
172. Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, Thomas PJ. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(24):21111-4.
173. Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeeasingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*. 1992;68(4):809-18.
174. Hegyi P, Rakonczay Z, Jr. The role of pancreatic ducts in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2015;15(4 Suppl):S13-7.
175. Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, et al. Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. *Nagoya journal of medical science*. 2012;74(1-2):1-18.
176. Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(1):339-49.
177. Robert R, Norez C, Becq F. Disruption of CFTR chloride channel alters mechanical properties and cAMP-dependent Cl⁻ transport of mouse aortic smooth muscle cells. *The Journal of physiology*. 2005;568(Pt 2):483-95.
178. Michoud MC, Robert R, Hassan M, Moynihan B, Haston C, Govindaraju V, et al. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance channel in human airway smooth muscle. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(2):217-22.
179. Nagel G, Hwang TC, Nastiuk KL, Nairn AC, Gadsby DC. The protein kinase A-regulated cardiac Cl⁻ channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*. 1992;360(6399):81-4.
180. Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiological reviews*. 2000;80(1):31-81.

181. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nature cell biology*. 2006;8(9):933-44.
182. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *The American journal of physiology*. 1998;275(5 Pt 2):H1726-32.
183. Decherf G, Bouyer G, Egee S, Thomas SL. Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007;39(1):24-34.
184. LaRusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology*. 2011;27(5):467-74.
185. Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012;11(5):355-62.
186. Behrendorff N, Floetenmeyer M, Schwiening C, Thorn P. Protons released during pancreatic acinar cell secretion acidify the lumen and contribute to pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1711-20, 20.e1-5.
187. Pallagi P, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr., Borka K, Korompay A, Ozsvari B, et al. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl(-) channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2228-39.e6.
188. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991;10(1):214-28.
189. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, NY)*. 1989;245(4922):1073-80.
190. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, NY)*. 1989;245(4922):1066-73.
191. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, NY)*. 1989;245(4922):1059-65.

192. Cordovado SK, Hendrix M, Greene CN, Mochal S, Earley MC, Farrell PM, et al. CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2012;105(2):249-54.
193. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;145:19-34.
194. Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in genetics : TIG*. 1992;8(11):392-8.
195. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *American journal of human genetics*. 1992;50(6):1178-84.
196. Ahmed N, Corey M, Forstner G, Zielenski J, Tsui LC, Ellis L, et al. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut*. 2003;52(8):1159-64.
197. Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, et al. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011;140(1):153-61.
198. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of human genetics*. 2003;67(Pt 5):471-85.
199. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nature medicine*. 1996;2(4):467-9.
200. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9640):719-27.
201. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(10):1262-72.
202. Dormer RL, Harris CM, Clark Z, Pereira MM, Doull IJ, Norez C, et al. Sildenafil (Viagra) corrects DeltaF508-CFTR location in nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60(1):55-9.

203. Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(10):2457-65.
204. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *The New England journal of medicine*. 2010;363(21):1991-2003.
205. Kaiser J. Personalized medicine. New cystic fibrosis drug offers hope, at a price. *Science* (New York, NY). 2012;335(6069):645.
206. Al-Nakkash L, Hu S, Li M, Hwang TC. A common mechanism for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein activation by genistein and benzimidazolone analogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;296(2):464-72.
207. Cai Z, Sheppard DN. Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):19546-53.
208. Bertrand J, Boucherle B, Billet A, Melin-Heschel P, Dannhoffer L, Vandebrouck C, et al. Identification of a novel water-soluble activator of wild-type and F508del CFTR: GPact-11a. *The European respiratory journal*. 2010;36(2):311-22.
209. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(2):484-90.
210. Roque T, Boncoeur E, Saint-Criq V, Bonvin E, Clement A, Tabary O, et al. Proinflammatory effect of sodium 4-phenylbutyrate in deltaF508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator lung epithelial cells: involvement of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;326(3):949-56.
211. Cai Z, Taddei A, Sheppard DN. Differential sensitivity of the cystic fibrosis (CF)-associated mutants G551D and G1349D to potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):1970-7.

212. Ooi CY, Gonska T, Durie PR, Freedman SD. Genetic testing in pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2202-6, 6.e1.
213. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*. 1993;362(6416):160-4.
214. Shrimpton AE. R117H and IVS8-5T cystic fibrosis mutation detection by restriction enzyme digestion. *Molecular diagnosis : a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology*. 2000;5(3):235-8.
215. Uzun S, Gokce S, Wagner K. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2005;207(4):279-85.
216. Yu YC, Sohma Y, Hwang TC. On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of physiology*. 2016;594(12):3227-44.
217. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440(7083):477-83.
218. Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(2):487-96.
219. Huang Q, Ding W, Wei MX. Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(12):1925-30.
220. Ni WH, Jiang L, Fei QJ, Jin JY, Yang X, Huang XF. The CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Asian journal of andrology*. 2012;14(5):687-90.
221. Lazaro C, de Cid R, Sunyer J, Soriano J, Gimenez J, Alvarez M, et al. Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma. *Human mutation*. 1999;14(6):510-9.

222. Casals T, De-Gracia J, Gallego M, Dorca J, Rodriguez-Sanchon B, Ramos MD, et al. Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for CFTR gene mutations? *Clinical genetics*. 2004;65(6):490-5.
223. Stankovic M, Nikolic A, Divac A, Tomovic A, Petrovic-Stanojevic N, Andjelic M, et al. The CFTR M470V gene variant as a potential modifier of COPD severity: study of Serbian population. *Genetic testing*. 2008;12(3):357-62.
224. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Human mutation*. 1994;4(3):167-77.
225. Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, De Boeck C, Cassiman JJ. CFTR haplotype backgrounds on normal and mutant CFTR genes. *Human molecular genetics*. 1994;3(4):607-14.
226. Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, et al. Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *European journal of human genetics : EJHG*. 1995;3(5):285-93.
227. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *The New England journal of medicine*. 1995;332(22):1475-80.
228. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature genetics*. 1993;3(2):151-6.
229. Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ, Jr., Moss J, Dalemans W, Jallat S, et al. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *The EMBO journal*. 1991;10(6):1355-63.
230. Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, Yang Y, et al. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Human molecular genetics*. 1993;2(3):225-30.
231. Mak V, Jarvi KA, Zielenski J, Durie P, Tsui LC. Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Human molecular genetics*. 1997;6(12):2099-107.

232. Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Madjar I, Goshen R, Augarten A, et al. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *American journal of human genetics*. 1997;60(1):87-94.
233. Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle FE. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Human molecular genetics*. 1999;8(13):2339-49.
234. Kiewewetter S, Macek M, Jr., Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature genetics*. 1993;5(3):274-8.
235. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. 2007;45(2):27-37.
236. Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scandinavian journal of immunology*. 1988;27(6):705-16.
237. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet (London, England)*. 1997;349(9046):170-3.
238. Weiss FU, Simon P, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM. Germline mutations and gene polymorphism associated with human pancreatitis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2006;35(2):289-302, viii-ix.
239. Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut*. 1997;40(1):1-4.
240. van der Poll T, van Deventer SJ, Hack CE, Wolbink GJ, Aarden LA, Buller HR, et al. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood*. 1992;79(3):693-8.
241. van Deventer SJ, Hart M, van der Poll T, Hack CE, Aarden LA. Endotoxin and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release in humans. *The Journal of infectious diseases*. 1993;167(2):461-54.

242. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(9):3666-70.
243. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science (New York, NY)*. 1985;230(4726):630-2.
244. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annual review of immunology*. 1989;7:625-55.
245. Wang AM, Creasey AA, Ladner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdell JN, et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science (New York, NY)*. 1985;228(4696):149-54.
246. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science (New York, NY)*. 1986;232(4753):977-80.
247. Sariban E, Imamura K, Luebbers R, Kufe D. Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(5):1506-10.
248. Collart MA, Belin D, Vassalli JD, de Kossodo S, Vassalli P. Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *The Journal of experimental medicine*. 1986;164(6):2113-8.
249. Gifford GE, Lohmann-Matthes ML. Requirement for the continual presence of lipopolysaccharide for production of tumor necrosis factor by thioglycollate-induced peritoneal murine macrophages. *International journal of cancer*. 1986;38(1):135-7.
250. Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(2):465-75.
251. Smith RA, Kirstein M, Fiers W, Baglioni C. Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. A comparative study of tumor necrosis factor receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(32):14871-4.
252. Creasey AA, Yamamoto R, Vitt CR. A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(10):3293-7.

253. Kull FC, Jacobs S, Cuatrecasas P. Cellular receptor for ¹²⁵I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(17):5756-60.
254. Scheurich P, Ucer U, Kronke M, Pfizenmaier K. Quantification and characterization of high-affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. *International journal of cancer*. 1986;38(1):127-33.
255. Israel S, Hahn T, Holtmann H, Wallach D. Binding of human TNF- α to high-affinity cell surface receptors: effect of IFN. *Immunology letters*. 1986;12(4):217-24.
256. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Jr., Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science (New York, NY)*. 1985;230(4728):943-5.
257. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, et al. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(3):632-43.
258. Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;135(6):3972-7.
259. Pingleton WW, Coalson JJ, Guenter CA. Significance of leukocytes in endotoxic shock. *Experimental and molecular pathology*. 1975;22(2):183-94.
260. Brigham KL, Meyrick B. Interactions of granulocytes with the lungs. *Circulation research*. 1984;54(6):623-35.
261. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(24):8667-71.
262. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA, Jr. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- γ and tumor necrosis factors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;135(3):2069-73.
263. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1986;136(11):4220-5.

264. Djeu JY, Blanchard DK, Halkias D, Friedman H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1986;137(9):2980-4.
265. Berger M, Wetzler EM, Wallis RS. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood*. 1988;71(1):151-8.
266. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1987;138(5):1469-74.
267. Bermudez LE, Young LS. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1988;140(9):3006-13.
268. Troppmair J, Aubock J, Niederwieser D, Schonitzer D, Huber C. Interferons (IFNs) and tumor necrosis factors (TNFs) in T cell-mediated immune responses against alloantigens. I. Influence on the activation of resting and antigen-primed T cells. *Immunobiology*. 1988;176(3):236-54.
269. Conta BS, Powell MB, Ruddle NH. Activation of Lyt-1+ and Lyt-2+ T cell cloned lines: stimulation of proliferation, lymphokine production, and self-destruction. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1985;134(4):2185-90.
270. Ruddle NH. Lymphotoxin production in AIDS. *Immunology today*. 1986;7(1):8-9.
271. Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, et al. Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* (London, England). 1988;1(8592):969-71.
272. Kawakami M, Cerami A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *The Journal of experimental medicine*. 1981;154(3):631-9.
273. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *The Journal of experimental medicine*. 1985;161(5):984-95.
274. Goldberg AL, Kettelhut IC, Furuno K, Fagan JM, Baracos V. Activation of protein breakdown and prostaglandin E2 production in rat skeletal muscle in fever is signaled by a

macrophage product distinct from interleukin 1 or other known monokines. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(5):1378-83.

275. Kettelhut IC, Goldberg AL. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(5):1384-9.

276. Tracey KJ, Lowry SF, Beutler B, Cerami A, Albert JD, Shires GT. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. *The Journal of experimental medicine*. 1986;164(4):1368-73.

277. Gaskill HV, 3rd. Continuous infusion of tumor necrosis factor: mechanisms of toxicity in the rat. *The Journal of surgical research*. 1988;44(6):664-71.

278. Perlmutter DH, Dinarello CA, Punsal PI, Colten HR. Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *The Journal of clinical investigation*. 1986;78(5):1349-54.

279. Moldawer LL, Andersson C, Gelin J, Lundholm KG. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. *The American journal of physiology*. 1988;254(3 Pt 1):G450-6.

280. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science (New York, NY)*. 1986;234(4775):470-4.

281. Patton JS, Peters PM, McCabe J, Crase D, Hansen S, Chen AB, et al. Development of partial tolerance to the gastrointestinal effects of high doses of recombinant tumor necrosis factor-alpha in rodents. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(6):1587-96.

282. Leist TP, Frei K, Kam-Hansen S, Zinkernagel RM, Fontana A. Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;167(5):1743-8.

283. Mustafa MM, Ramilo O, Mertsola J, Risser RC, Beutler B, Hansen EJ, et al. Modulation of inflammation and cachectin activity in relation to treatment of experimental *Hemophilus influenzae* type b meningitis. *The Journal of infectious diseases*. 1989;160(5):818-25.

284. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(6):1433-50.

285. Cybulsky MI, McComb DJ, Movat HZ. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1988;140(9):3144-9.
286. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *The Journal of experimental medicine*. 1985;162(6):2163-8.
287. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science (New York, NY)*. 1985;229(4716):869-71.
288. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662-4.
289. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1987;164(5):415-22.
290. Mannel DN, Falk W, Northoff H. Endotoxic activities of tumor necrosis factor independent of IL1 secretion by macrophages/monocytes. *Lymphokine research*. 1987;6(3):151-9.
291. Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(24):9769-73.
292. Goldfeld AE, Strominger JL, Doyle C. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(1):73-81.
293. Economou JS, Rhoades K, Essner R, McBride W, Gasson J, Morton D. Genetic analysis of the human tumor necrosis factor alpha/cachectin promoter region in a macrophage cell line. *Journal of Experimental Medicine*. 1989;170(1):321-6.
294. Sung S, Walters J, Hudson J, Gimble J. Tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation in human myelomonocytic cell lines. Role of transcriptional regulation by DNA sequence motifs and mRNA stabilization. *The Journal of Immunology*. 1991;147(6):2047-54.

295. Han J, Huez G, Beutler B. Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3'-untranslated regions. *The Journal of Immunology*. 1991;146(6):1843-8.
296. Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, et al. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Current drug targets Inflammation and allergy*. 2002;1(4):393-403.
297. Helmut S. *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1986;25(12):1058-71.
298. Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 1988;3(2-3):105-12.
299. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1996;110(2):639-42.
300. Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepato-gastroenterology*. 1993;40(6):522-30.
301. Kwaan HC, Anderson MC, Gramatica L. A study of pancreatic enzymes as a factor in the pathogenesis of disseminated intravascular coagulation during acute pancreatitis. *Surgery*. 1971;69(5):663-72.
302. Morgan AP, Jenny ME, Haessler H. Phospholipids, acute pancreatitis, and the lungs: effect of lecithinase infusion on pulmonary surface activity in dogs. *Annals of surgery*. 1968;167(3):329-35.
303. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *Jama*. 1993;269(14):1829-35.
304. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(4):1162-72.
305. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *The New England journal of medicine*. 1987;316(7):379-85.
306. Christman JW. Potential treatment of sepsis syndrome with cytokine-specific agents. *Chest*. 1992;102(2):613-7.

307. Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, et al. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery*. 1994;115(2):213-21.
308. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1995;130(9):966-70.
309. De Beaux AC, Fearon KC. Circulating endotoxin, tumour necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1996;219:43-6.
310. Granell S, Pereda J, Gomez-Cambronero L, Cassinello N, Sabater L, Closa D, et al. Circulating TNF-alpha and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis. *Cytokine*. 2004;25(4):187-91.
311. Folch E, Serrano A, Sabater L, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D. Soluble receptors released during acute pancreatitis interfere with the detection of tumor necrosis factor-alpha. *Critical care medicine*. 2001;29(5):1023-6.
312. Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, et al. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000;21(2):141-6.
313. Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, et al. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Digestive diseases and sciences*. 1997;42(8):1783-8.
314. Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobashevsky A, Sabek O, Gaber AO. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 1995;59(6):687-93.
315. Gukovskaya AS, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, et al. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology*. 1996;110(3):875-84.
316. Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, et al. Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1741-6.

317. McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1996;83(7):919-23.
318. Katuchova J, Bober J, Harbulak P, Hudak A, Gajdzik T, Kalanin R, et al. Obesity as a risk factor for severe acute pancreatitis patients. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2014;126(7-8):223-7.
319. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-alpha and obesity. *Current directions in autoimmunity*. 2010;11:145-56.
320. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(7):1853-62.
321. Fu K, Sarras MP, Jr., De Lisle RC, Andrews GK. Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis. *The American journal of physiology*. 1997;273(3 Pt 1):G696-705.
322. Hughes CB, Gaber LW, Mohey el-Din AB, Grewal HP, Kotb M, Mann L, et al. Inhibition of TNF alpha improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *The American surgeon*. 1996;62(1):8-13.
323. Norman JG, Fink GW, Messina J, Carter G, Franz MG. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery*. 1996;120(3):515-21.
324. de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1996;83(3):349-53.
325. D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*. 1994;39(2):150-4.
326. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Dalboge H, Baek L, et al. A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus. *Scandinavian journal of immunology*. 1991;33(1):37-49.
327. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Critical care medicine*. 1996;24(3):381-4.

328. Rinderknecht H. Genetic determinants of mortality in acute necrotizing pancreatitis. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 1994;16(1):11-5.
329. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(22):8699-702.
330. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):216-28.
331. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Human molecular genetics*. 1992;1(5):353.
332. Ozhan G, Yanar HT, Ertekin C, Alpertunga B. Polymorphisms in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) gene in patients with acute pancreatitis. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:482950.
333. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(2):557-60.
334. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3195-9.
335. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular immunology*. 1997;34(5):391-9.
336. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *Journal of inflammation*. 1995;46(1):32-41.
337. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994;371(6497):508-10.

338. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1259-64.
339. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(4):878-80.
340. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *Jama*. 1999;282(6):561-8.
341. Meng N, Zhang Y, Li H, Ma J, Qu Y. Association of tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism (TNF-alpha 238 G/A and TNF-alpha 308 G/A) with diabetic mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Current eye research*. 2014;39(2):194-203.
342. Beranek H, Teich N, Witt H, Schulz HU, Mossner J, Keim V. Analysis of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter variants in patients with chronic pancreatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2003;15(11):1223-7.
343. Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. *Annual review of immunology*. 1988;6:407-38.
344. Kehrl JH, Alvarez-Mon M, Delsing GA, Fauci AS. Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells. *Science (New York, NY)*. 1987;238(4830):1144-6.
345. Steffen M, Ottmann OG, Moore MA. Simultaneous production of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin by normal T cells after induction with IL-2 and anti-T3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1988;140(8):2621-4.
346. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*. 1985;318(6047):665-7.
347. Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinmann R, Perussia B, Trinchieri G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1987;165(6):1581-94.
348. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA, Jr., Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;135(4):2492-7.

349. Svedersky LP, Nedwin GE, Goeddel DV, Palladino MA, Jr. Interferon-gamma enhances induction of lymphotoxin in recombinant interleukin 2-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;134(3):1604-8.
350. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312:724.
351. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*. 1984;312(5996):721-4.
352. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids research*. 1985;13(17):6361-73.
353. Umeda T, Hara T, Nijima T. Cytotoxic effect of tumor necrosis factor on human lymphocytes and specific binding of the factor to the target cells. *Cellular and molecular biology*. 1983;29(5):349-52.
354. Aggarwal BB, Henzel WJ, Moffat B, Kohr WJ, Harkins RN. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(4):2334-44.
355. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(1):209-19.
356. Sargen K, Demaine AG, Kingsnorth AN. Cytokine gene polymorphisms in acute pancreatitis. *JOP : Journal of the pancreas*. 2000;1(2):24-35.
357. Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, et al. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*. 1993;72(6):847-56.
358. Badenhop K, Schwarz G, Trowsdale J, Lewis V, Usadel KH, Gale EA, et al. TNF-alpha gene polymorphisms in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989;32(7):445-8.

359. Dawkins RL, Leaver A, Cameron PU, Martin E, Kay PH, Christiansen FT. Some disease-associated ancestral haplotypes carry a polymorphism of TNF. *Human immunology*. 1989;26(2):91-7.
360. Fugger L, Morling N, Ryder LP, Georgsen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, et al. NcoI restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF alpha) region in four autoimmune diseases. *Tissue antigens*. 1989;34(1):17-22.
361. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *European journal of immunology*. 1993;23(1):224-31.
362. Morgan DS, Afifi RA, El-Hoseiny SM, Amin DG, Ibrahim SYG. The potential association of tumor necrosis factor-betaeta (252 G/A) cytokine gene polymorphism with immune thrombocytopenic purpura among Egyptian children. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2018;23(5):299-303.
363. Abraham LJ, French MA, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clinical and experimental immunology*. 1993;92(1):14-8.
364. Molvig J, Pociot F, Baek L, Worsaae H, Dall Wogensen L, Christensen P, et al. Monocyte function in IDDM patients and healthy individuals. *Scandinavian journal of immunology*. 1990;32(3):297-311.
365. Ishii M, Onaya T, Katoh H, Kiuchi Y, Kasai H, Kawamura M, et al. Association between the G252A Tumor Necrosis Factor-beta Gene Polymorphism and Medication-Overuse Headache. *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)*. 2012;8(4):301-4.
366. Cho JH, Kim TN, Chung HH, Kim KH. Comparison of scoring systems in predicting the severity of acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(8):2387-94.
367. Pezzilli R, Zerbi A, Campra D, Capurso G, Golfieri R, Arcidiacono PG, et al. Consensus guidelines on severe acute pancreatitis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2015;47(7):532-43.
368. Garg PK, Madan K, Pande GK, Khanna S, Sathyanarayan G, Bohidar NP, et al. Association of extent and infection of pancreatic necrosis with organ failure and death in acute

necrotizing pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2005;3(2):159-66.

369. Acosta JM, Katkhouda N, Debian KA, Groshen SG, Tsao-Wei DD, Berne TV. Early ductal decompression versus conservative management for gallstone pancreatitis with ampullary obstruction: a prospective randomized clinical trial. *Annals of surgery*. 2006;243(1):33-40.

370. McKay CJ, Curran F, Sharples C, Baxter JN, Imrie CW. Prospective placebo-controlled randomized trial of lexipafant in predicted severe acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1997;84(9):1239-43.

371. Mery CM, Rubio V, Duarte-Rojo A, Suazo-Barahona J, Pelaez-Luna M, Milke P, et al. Android fat distribution as predictor of severity in acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2002;2(6):543-9.

372. Murray B, Carter R, Imrie C, Evans S, O'Suilleabhain C. Diclofenac reduces the incidence of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1786-91.

373. Masci E, Cavallini G, Mariani A, Frulloni L, Testoni PA, Curioni S, et al. Comparison of two dosing regimens of gabexate in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(10):2182-6.

374. Rahman SH, Ibrahim K, Larvin M, Kingsnorth A, McMahon MJ. Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1312-22.

375. Remes-Troche JM, Uscanga LF, Pelaez-Luna M, Duarte-Rojo A, Gonzalez-Balboa P, Teliz MA, et al. When should we be concerned about pancreatic necrosis? Analysis from a single institution in Mexico City. *World journal of surgery*. 2006;30(12):2227-33; discussion 34-5.

376. Mora J, Comas L, Ripoll E, Goncalves P, Queralto JM, Gonzalez-Sastre F, et al. Genetic mutations in a Spanish population with chronic pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2009;9(5):644-51.

377. Qiao D, Yi L, Hua L, Xu Z, Ding Y, Shi D, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene 5T allele may protect against prostate cancer: a case-control study in Chinese Han population. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008;7(3):210-4.

378. Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut*. 1999;45(3):317-22.
379. Papachristou GI, Whitcomb DC. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. *Gastroenterology clinics of North America*. 2004;33(4):871-90.
380. Cavallini G, Tittobello A, Frulloni L, Masci E, Mariana A, Di Francesco V. Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gabexate in digestive endoscopy--Italian Group. *The New England journal of medicine*. 1996;335(13):919-23.
381. Varallyay E, Pal G, Patthy A, Szilagy L, Graf L. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;243(1):56-60.
382. Sahin-Toth M. Hereditary pancreatitis-associated mutation asn(21) --> ile stabilizes rat trypsinogen in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(42):29699-704.
383. Sahin-Toth M, Graf L, Toth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-->His: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis? *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;264(2):505-8.
384. Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen. Role of Asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(30):22750-5.
385. Kukor Z, Toth M, Pal G, Sahin-Toth M. Human cationic trypsinogen. Arg(117) is the reactive site of an inhibitory surface loop that controls spontaneous zymogen activation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(8):6111-7.
386. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Bhaskar S, Sriram PV, Singh L. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *Journal of medical genetics*. 2002;39(5):347-51.
387. Sanchez-Ramirez CA, Larrosa-Haro A, Flores-Martinez S, Sanchez-Corona J, Villa-Gomez A, Macias-Rosales R. Acute and recurrent pancreatitis in children: etiological factors. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2007;96(4):534-7.
388. Keim V. Role of genetic disorders in acute recurrent pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(7):1011-5.

389. Keim V, Witt H, Bauer N, Bodeker H, Rosendahl J, Teich N, et al. The course of genetically determined chronic pancreatitis. *JOP : Journal of the pancreas*. 2003;4(4):146-54.
390. Poddar U, Yachha SK, Mathias A, Choudhuri G. Genetic predisposition and its impact on natural history of idiopathic acute and acute recurrent pancreatitis in children. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2015;47(8):709-14.
391. Ferec C, Raguenes O, Salomon R, Roche C, Bernard JP, Guillot M, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *Journal of medical genetics*. 1999;36(3):228-32.
392. Teich N, Mossner J, Keim V. Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Human mutation*. 1998;12(1):39-43.
393. Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1999;117(1):7-10.
394. Bell SM, Bennett C, Markham AF, Lench NJ. Evidence for a common mutation in hereditary pancreatitis. *Molecular pathology : MP*. 1998;51(2):115-7.
395. Dasouki MJ, Cogan J, Summar ML, Neblitt W, 3rd, Foroud T, Koller D, et al. Heterogeneity in hereditary pancreatitis. *American journal of medical genetics*. 1998;77(1):47-53.
396. Elitsur Y, Chertow BC, Jewell RD, Finver SN, Primerano DA. Identification of a hereditary pancreatitis mutation in four West Virginia families. *Pediatric research*. 1998;44(6):927-30.
397. Applebaum-Shapiro SE, Finch R, Pfutzer RH, Hepp LA, Gates L, Amann S, et al. Hereditary pancreatitis in North America: the Pittsburgh-Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2001;1(5):439-43.
398. Keim V, Bauer N, Teich N, Simon P, Lerch MM, Mossner J. Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the cationic trypsinogen gene. *The American journal of medicine*. 2001;111(8):622-6.
399. Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C, Ruszniewski P, Robaszkiewicz M, Raguenes O, et al. Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002;10(2):100-6.

400. Perri F, Piepoli A, Andriulli A. On the role of CFTR, PSSR1 and PST1/SPINK1 in idiopathic chronic pancreatitis. *European journal of human genetics : EJHG*. 2003;11(2):107; author reply 8.

401. Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Mani KR, Bhaskar S, Rao GV, et al. Absence of PRSS1 mutations and association of SPINK1 trypsin inhibitor mutations in hereditary and non-hereditary chronic pancreatitis. *Gut*. 2004;53(5):723-8.

402. Joergensen MT, Brusgaard K, Cruger DG, Gerdes AM, Schaffalitzky de Muckadell OB. Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(8):1876-83.

403. Gasiorska A, Talar-Wojnarowska R, Czupryniak L, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, et al. The prevalence of cationic trypsinogen (PRSS1) and serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene mutations in Polish patients with alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56(3):894-901.

404. Masson E, Chen JM, Audrezet MP, Cooper DN, Ferec C. A conservative assessment of the major genetic causes of idiopathic chronic pancreatitis: data from a comprehensive analysis of PRSS1, SPINK1, CTRC and CFTR genes in 253 young French patients. *PloS one*. 2013;8(8):e73522.

405. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Ferec C. Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *Journal of medical genetics*. 2000;37(1):67-9.

406. Treiber M, Schlag C, Schmid RM. Genetics of pancreatitis: a guide for clinicians. *Current gastroenterology reports*. 2008;10(2):122-7.

407. Wang GP, Xu CS. Pancreatic secretory trypsin inhibitor: More than a trypsin inhibitor. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2010;1(2):85-90.

408. Ohmuraya M, Yamamura K. Roles of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases. *Experimental animals*. 2011;60(5):433-44.

409. Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, Howes N, Lerch MM, Simon P, et al. The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut*. 2002;50(5):675-81.
410. Schneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, et al. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011;140(1):162-71.
411. Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut*. 2003;52 Suppl 2:ii31-41.
412. Hendy GN, Canaff L, Cole DE. The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013;27(3):285-301.
413. Felderbauer P, Hoffmann P, Einwachter H, Bulut K, Ansorge N, Schmitz F, et al. A novel mutation of the calcium sensing receptor gene is associated with chronic pancreatitis in a family with heterozygous SPINK1 mutations. *BMC gastroenterology*. 2003;3:34.
414. Hirota M, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *JOP : Journal of the pancreas*. 2003;4(2):83-8.
415. Ockenga J, Dork T, Stuhmann M. Low prevalence of SPINK1 gene mutations in adult patients with chronic idiopathic pancreatitis. *Journal of medical genetics*. 2001;38(4):243-4.
416. Diaconu BL, Ciobanu L, Mocan T, Pfutzer RH, Scafaru MP, Acalovschi M, et al. Investigation of the SPINK1 N34S mutation in Romanian patients with alcoholic chronic pancreatitis. A clinical analysis based on the criteria of the M-ANNHEIM classification. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2009;18(2):143-50.
417. Witt H. The SPINK in chronic pancreatitis: similar finds, different minds. *Gut*. 2002;50(5):590-1.
418. Girman CJ, Kou TD, Cai B, Alexander CM, O'Neill EA, Williams-Herman DE, et al. Patients with type 2 diabetes mellitus have higher risk for acute pancreatitis compared with those without diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12(9):766-71.
419. Hou SW, Lee YK, Hsu CY, Lee CC, Su YC. Increased risk of acute pancreatitis in patients with chronic hemodialysis: a 4-year follow-up study. *PloS one*. 2013;8(8):e71801.

420. Francisco M, Valentin F, Cubiella J, Fernandez-Seara J. Factors related to length of hospital admission in mild interstitial acute pancreatitis. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. 2013;105(2):84-92.
421. Weitz G, Weitalla J, Wellhoner P, Schmidt KJ, Buning J, Fellermann K. Comorbidity in acute pancreatitis relates to organ failure but not to local complications. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2016;54(3):226-30.
422. Dray X, Fajac I, Bienvenu T, Chrystostalis A, Sogni P, Hubert D. Association of pancreas divisum and recurrent acute pancreatitis with the IVS8-5T-12TG allele of the CFTR gene and CFTR dysfunction. *Pancreas*. 2007;35(1):90-3.
423. Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V and R75Q in healthy Serbian population. *Genetika*. 2006;42(7):996-8.
424. Bombieri C, Giorgi S, Carles S, de Cid R, Belpinati F, Tandoi C, et al. A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Human genetics*. 2000;106(2):172-8.
425. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(1):25-35.
426. Muthuswamy S, Agarwal S, Awasthi S, Singh S, Dixit P, Maurya N, et al. Spectrum and distribution of CFTR gene mutations in asthma and chronic pancreatitis cases of North Indian population. *Gene*. 2014;539(1):125-31.
427. Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Yutsudo Y, Kasuga M. Polymorphism of cystic fibrosis gene in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(10):2007-12.
428. de Cid R, Chomel JC, Lazaro C, Sunyer J, Baudis M, Casals T, et al. CFTR and asthma in the French EGEA study. *European journal of human genetics : EJHG*. 2001;9(1):67-9.
429. Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, et al. CFTR gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Human genetics*. 2001;108(3):216-21.

430. Ngiam NS, Chong SS, Shek LP, Goh DL, Ong KC, Chng SY, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in Asians with chronic pulmonary disease: a pilot study. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2006;5(3):159-64.
431. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Nordestgaard BG. Asthma and COPD in cystic fibrosis intron-8 5T carriers. A population-based study. *Respiratory research*. 2005;6:113.
432. Munthe-Kaas MC, Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH, Skinningsrud B, Haland G, Devulapalli CS, et al. CFTR gene mutations and asthma in the Norwegian Environment and Childhood Asthma study. *Respiratory medicine*. 2006;100(12):2121-8.
433. Kim KW, Lee JH, Lee MG, Kim KH, Sohn MH, Kim KE. Association between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and susceptibility for childhood asthma in Korea. *Yonsei medical journal*. 2010;51(6):912-7.
434. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1310-9.
435. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 1998;339(10):645-52.
436. Frulloni L, Castellani C, Bovo P, Vaona B, Calore B, Liani C, et al. Natural history of pancreatitis associated with cystic fibrosis gene mutations. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2003;35(3):179-85.
437. Cuppens H, Cassiman JJ. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *International journal of andrology*. 2004;27(5):251-6.
438. Dayangac D, Erdem H, Yilmaz E, Sahin A, Sohn C, Ozguc M, et al. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(5):1094-100.
439. Radpour R, Gilani MA, Gourabi H, Dizaj AV, Mollamohamadi S. Molecular analysis of the IVS8-T splice variant 5T and M470V exon 10 missense polymorphism in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Molecular human reproduction*. 2006;12(7):469-73.

440. Grangeia A, Niel F, Carvalho F, Fernandes S, Ardalan A, Girodon E, et al. Characterization of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly(T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(11):2502-8.
441. Wu CC, Hsieh-Li HM, Lin YM, Chiang HS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene screening and clinical correlation in Taiwanese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(2):250-3.
442. Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, Hargrave MR, Lovelock PK, Welsh MJ, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nature genetics*. 1993;4(4):426-31.
443. Hegyi P, Maleth J, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr. Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar Acid load. *Frontiers in physiology*. 2011;2:36.
444. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human mutation*. 2002;19(6):575-606.
445. Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr., Ozsvari B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, et al. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut*. 2008;57(8):1102-12.
446. Bhoomagoud M, Jung T, Atladottir J, Kolodecik TR, Shugrue C, Chaudhuri A, et al. Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats. *Gastroenterology*. 2009;137(3):1083-92.
447. Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC. On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels. *The Journal of general physiology*. 2003;121(1):17-36.
448. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. Strict coupling between CFTR's catalytic cycle and gating of its Cl⁻ ion pore revealed by distributions of open channel burst durations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(3):1241-6.
449. Berger AL, Ikuma M, Welsh MJ. Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(2):455-60.
450. Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR. The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide

Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):15419-25.

451. Mornon JP, Lehn P, Callebaut I. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(16):2594-612.

452. Belmonte L, Moran O. On the interactions between nucleotide binding domains and membrane spanning domains in cystic fibrosis transmembrane regulator: A molecular dynamic study. *Biochimie*. 2015;111:19-29.

453. Jiang L, Jin J, Wang S, Zhang F, Dai Y, Shi L, et al. CFTR gene mutations and polymorphism are associated with non-obstructive azoospermia: From case-control study. *Gene*. 2017;626:282-9.

454. Boudaya M, Fredj SH, Haj RB, Khrouf M, Bouker A, Halouani L, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations and polymorphisms associated with congenital bilateral absence of vas deferens in a restricted group of patients from North Africa. *Annals of human biology*. 2012;39(1):76-9.

455. CD. J. Organ failure and acute pancreatitis. In: Forsmark CE, Gardner TB, editors. *Prediction and management of severe acute pancreatitis*. New York: Springer; 2015. p.15-27.

456. Widdicombe JH, Wine JJ. Airway Gland Structure and Function. *Physiological reviews*. 2015;95(4):1241-319.

457. Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadasz I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, et al. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(25):E2308-16.

458. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(12):911-22.

459. Weiss LA, Pan L, Abney M, Ober C. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nature genetics*. 2006;38(2):218-22.

460. Stankovic A, Zivkovic M, Alavantic D. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in a Serbian population: a gender-specific association with hypertension. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(6):469-75.

461. Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, Chen SX, Collier DA, Craddock NJ, et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS genetics*. 2008;4(2):e28.
462. Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafre SA, D'Arcangelo G, Farace MG, et al. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):303-9.
463. Sun W, Anderson B, Redman J, Milunsky A, Buller A, McGinniss MJ, et al. CFTR 5T variant has a low penetrance in females that is partially attributable to its haplotype. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2006;8(6):339-45.
464. Shawky RM. Reduced penetrance in human inherited disease. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(2):103-11.
465. Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(12):1427-30.
466. Lankisch PG, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Acute pancreatitis: does gender matter? *Digestive diseases and sciences*. 2001;46(11):2470-4.
467. Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, White RH. The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas*. 2006;33(4):336-44.
468. Weitz G, Woitalla J, Wellhoner P, Schmidt K, Buning J, Fellermann K. Does etiology of acute pancreatitis matter? A review of 391 consecutive episodes. *JOP : Journal of the pancreas*. 2015;16(2):171-5.
469. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *The American journal of physiology*. 1995;269(5 Pt 1):C1295-304.
470. Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, et al. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006;290(2):G232-41.
471. Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, et al. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell death and differentiation*. 2007;14(7):1285-94.

472. Bhatia M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8(3):402-9.
473. Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, et al. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(6):3370-81.
474. Rottner M, Kunzelmann C, Mergey M, Freyssinet JM, Martinez MC. Exaggerated apoptosis and NF-kappaB activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(11):2939-48.
475. Badalov N, Baradarian R, Iswara K, Li J, Steinberg W, Tenner S. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2007;5(6):648-61; quiz 4.
476. Singh AK, Schultz BD, Katzenellenbogen JA, Price EM, Bridges RJ, Bradbury NA. Estrogen inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride secretion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000;295(1):195-204.
477. Lieb JG, 2nd, Toskes PP. A pilot retrospective study of the relationship between estrogen use and pancreatitis/pancreatic function in women with chronic abdominal pain. *JOP : Journal of the pancreas*. 2013;14(3):237-42.
478. Chen H, Guo JH, Lu YC, Ding GL, Yu MK, Tsang LL, et al. Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(3):923-32.
479. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 2004;25(6):947-70.
480. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5479):625-8.
481. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *Journal of chronic diseases*. 1987;40(5):373-83.

482. Murata A, Ohtani M, Muramatsu K, Matsuda S. Influence of comorbidity on outcomes of older patients with acute pancreatitis based on a national administrative database. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2015;14(4):422-8.
483. Yang Z, Qi X, Wu Q, Li A, Xu P, Fan D. Lack of association between TNF-alpha gene promoter polymorphisms and pancreatitis: a meta-analysis. *Gene*. 2012;503(2):229-34.
484. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;50(4):535-41.
485. Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock (Augusta, Ga)*. 2007;28(2):130-40.
486. Powell JJ, Fearon KC, Siriwardena AK, Ross JA. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery*. 2001;129(5):633-40.
487. Weissensteiner T, Lanchbury JS. TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. *Immunogenetics*. 1997;47(1):6-16.
488. Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, et al. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 1996;59(3):676-83.
489. Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer*. 1997;80(8):1489-96.
490. Dianliang Z, Jieshou L, Zhiwei J, Baojun Y. Association of plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and its soluble receptors, two polymorphisms of the TNF gene, with acute severe pancreatitis and early septic shock due to it. *Pancreas*. 2003;26(4):339-43.
491. Chang YT, Chang MC, Su TC, Liang PC, Su YN, Kuo CH, et al. Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation/variant/haplotype and tumor necrosis factor (TNF) promoter polymorphism in hyperlipidemic pancreatitis. *Clinical chemistry*. 2008;54(1):131-8.

492. Farkas G, Jr., Hofner P, Balog A, Takacs T, Szabolcs A, Farkas G, et al. Relevance of transforming growth factor-beta1, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in patients with chronic pancreatitis. *European cytokine network*. 2007;18(1):31-7.
493. Schneider A, Pogue-Geile K, Barmada MM, Myers-Fong E, Thompson BS, Whitcomb DC. Hereditary, familial, and idiopathic chronic pancreatitis are not associated with polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter region or the TNF receptor 1 (TNFR1) gene. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2003;5(2):120-5.
494. Bendicho MT, Guedes JC, Silva NN, Santana GO, dos Santos RR, Lyra AC, et al. Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2005;30(4):333-6.
495. Schneider A, Barmada MM, Slivka A, Martin JA, Whitcomb DC. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta 1, interleukin-10, and interferon-gamma polymorphisms in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2004;32(1):19-24.
496. Balog A, Gyulai Z, Boros LG, Farkas G, Takacs T, Lonovics J, et al. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2005;30(2):e46-50.
497. Duell EJ, Casella DP, Burk RD, Kelsey KT, Holly EA. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF-A, RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(4):726-31.
498. O'Reilly DA, Dunlop S, Sargen K, Demaine A, Wilkinson S, Kingsnorth AN. Tumour necrosis factor microsatellite haplotypes are associated with chronic pancreatitis. *JOP : Journal of the pancreas*. 2006;7(1):14-26.
499. Howell WM, Pead PJ, Shek FW, Rose-Zerilli MJ, Armstrong T, Johnson CD, et al. Influence of cytokine and ICAM-1 gene polymorphisms on susceptibility to chronic pancreatitis. *Journal of clinical pathology*. 2005;58(6):595-9.

500. Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, Malecka-Panas E. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma genes polymorphisms and serum levels in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma*. 2009;56(1):56-62.
501. Tukiainen E, Kylanpaa ML, Puolakkainen P, Kemppainen E, Halonen K, Orpana A, et al. Polymorphisms of the TNF, CD14, and HSPA1B genes in patients with acute alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2008;37(1):56-61.
502. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clinical and experimental immunology*. 1998;113(3):401-6.
503. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;587:325-31.
504. van der Poll T, Sauerwein HP. Tumour necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1993;84(3):247-56.
505. Tracey KJ, Lowry SF. The role of cytokine mediators in septic shock. *Advances in surgery*. 1990;23:21-56.
506. Exley AR, Leese T, Holliday MP, Swann RA, Cohen J. Endotoxaemia and serum tumour necrosis factor as prognostic markers in severe acute pancreatitis. *Gut*. 1992;33(8):1126-8.
507. Chen CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(1):213-8.
508. Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2003;37(3):263-6.
509. Panek J, Karcz D, Pieton R, Zasada J, Tusinski M, Dolecki M, et al. Blood serum levels of proinflammatory cytokines in patients with different degrees of biliary pancreatitis. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2006;20(10):645-8.
510. Laveda R, Martinez J, Munoz C, Penalva JC, Saez J, Belda G, et al. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(34):5309-13.

511. Paajanen H, Laato M, Jaakkola M, Pulkki K, Niinikoski J, Nordback I. Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1995;82(2):271-3.
512. Zhang DL, Li JS, Jiang ZW, Yu BJ, Tang XM, Zheng HM. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute biliary pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2003;9(4):824-8.
513. Meyer A, Kubrusly MS, Salemi VM, De Mendonca Coelho AM, Molan NA, Patzina RA, et al. Severe acute pancreatitis: a possible role of intramyocardial cytokine production. *JOP : Journal of the pancreas*. 2014;15(3):237-42.
514. Singanayagam A, Schembri S, Chalmers JD. Predictors of mortality in hospitalized adults with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2013;10(2):81-9.
515. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nature genetics*. 2003;33(4):469-75.