

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İDİYOPATİK PANKREATİT OLGULARININ
MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ

Dr. Hasan BAŞ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2020

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İDİYOPATİK PANKREATİT OLGULARININ
MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ

Dr. Hasan BAŞ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

ESKİŞEHİR
2020

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Dr. Hasan BAŞ'a ait "İdiyopatik pankreatit olgularının moleküler genetik yöntemlerle incelenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 03.12.2020

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Selçuk DİŞİBEYAZ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Gülen Eda UTİNE
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla Onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ
Dekan

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen hocalarımdan; öncelikli olarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a hem tez dönemimde, hem de uzmanlık eğitimim boyunca tecrübeleri ve desteği ile bana katkıda bulunduğu için; vakalarımızın klinik değerlendirmesinde bulunan ve tezimin oluşumunda yardımlarını esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Selçuk DİŞİBEYAZ, Prof. Dr. Erkin ÖZTAŞ, Doç. Dr. Tuncer TEMEL ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji ve Hepatoloji Bilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Yusuf AYDEMİR'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca, tezimin bütün hazırlanış aşamaları ile asistanlık eğitimim boyunca yardıma ihtiyaç duyduğum her an yanımda olup desteğini esirgemeyen ve bütün bu süreçte öğrendiğim her şeyde muhakkak kendisinin de bir izi olan kıymetli hocam, değerli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP'e; geçmiş vakalarımızın yeniden değerlendirilmesi sürecinde değerli vakitlerini ayırıp hastalarımızın verilerini bize yeniden yönlendiren ve hatta kendi veritabanlarından da faydalanmamızı önererek tezimin kapsamını genişleten değerli hocam Doç. Dr. Serdar CEYLANER başta olmak üzere, Bio. Melike AKBAL ŞAHİN ve Mehmet GENÇ'e; biyoistatistik analizleri beraber yaptığımız arkadaşım Arş. Gör. Dr. Hülya YILMAZ ÖZEN'e, tezimin fikir oluşumu aşamasında yardımcı olan çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ezgi SUSAM'a ve laboratuvar analizleri sırasında desteklerini asla esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzm. Bio. Duygu ÇINAR, Bio. Okan AKÇINAR ve Kevser KÖKEN'e de teşekkürü borç bilirim.

Asistanlık eğitimimi de sonlandırdığım bu dönemde, eğitimim boyunca bana sağladıkları imkanlar dolayısıyla saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS ve Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR ile bu 4 yılı keyif alarak geçirmemi sağlayan, ayrılacağımızı hatırladığımda gözlerimin dolmasına neden olan kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sevgi IŞIK ve Uzm. Bio. Gülçin PANAL'e sonsuz teşekkürlerimle...

ÖZET

Baş, H. İdiyopatik pankreatit olgularının moleküler genetik yöntemlerle incelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2020. Pankreasın inflamasyonu ile karakterize olan pankreatit; gastrointestinal sistem ilişkili hastane başvurularının önde gelen sebeplerindendir ve önemli oranda morbidite, mortalite ile sosyoekonomik yüke yol açar. Multifaktöriyel bir hastalık olan pankreatitte herhangi bir risk faktörü olmayan olgular üzerine yapılan çalışmalarda özellikle *PRSS1*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinin varyasyonları tespit edilmiştir. Patojenik genetik değişimlere bağlı gelişen pankreatitlerin kronik pankreatit ve pankreas kanserine ilerleme riski artmıştır. Bu yüzden de altta genetik risk faktörlerinin bulunduğu olgularda diğer risk faktörlerinin ortadan kaldırılması, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve ailesel genetik danışmanlık açısından genetik analizlerin planlanması önem taşımaktadır. Çalışmamızda idiyopatik pankreatit olgularında *PRSS1*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinin yeni nesil sekanslama ile dizi varyasyonları ve MLPA analizi ile ekzon/tüm gen kopya sayısı değişimlerinin araştırılması planlandı. NGS analizi ile araştırmaya dahil edilen vakaların *PRSS1*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinde sırasıyla %16,3, %6,4, %6,4 ve %18,4'ünde klinikle ilişkili olabilecek varyant tespit edilirken, hiçbir olguda kopya sayısı değişimlerine rastlanmadı. Ayrıca olguların %8,9'unda farklı genlerin varyantları bir arada tespit edildi. Araştırma kapsamında değerlendirilen toplumda yaygın gözlenen varyantların allel frekansı arasında idiyopatik pankreatit olguları ile kontrol grubunda anlamlı fark gözlenmedi. Araştırma sonucunda kopya sayısı değişimlerinin toplumumuzda pankreatit etiolojisinde çok etkin olmayabileceği tespit edilirken, pankreatit vakalarında yeni nesil sekanslama ile gen panellerinin çalışılmasının tanı oranını anlamlı oranda artırdığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Pankreatit, Genetik, NGS, MLPA, *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR*, *CTRC*

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2019-2726

ABSTRACT

Baş, H. Investigations of idiopathic pancreatitis cases by molecular genetic methods. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Genetics, Eskişehir, 2020.

Pancreatitis, inflammation of the pancreas, is one of the leading causes of gastrointestinal system related hospital admissions and leads to significant amount of morbidity, mortality and socioeconomic burden. Pancreatitis is a multifactorial disorder and the studies performed on patients with no risk factors revealed that they had variations of *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* and *CFTR* genes. The patients who are carrier for pathogenic variants of these genes have high risk of developing chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Because of that, it is important to plan genetic analysis for patients to determine personalized medicine options, eliminate other risk factors and give genetic counselling to affected families. In this study, it was planned to explore the sequence variants of *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* and *CFTR* by next generation sequencing; and exon/gene copy number variants by MLPA analyses. NGS analyses revealed that 16,3%, 6,4%, 6,4% and 18,4% of our case group had sequence variants in *PRSSI*, *CFTR*, *SPINK1* and *CTRC* genes respectively, but none had copy number variations of these genes. It was also seen that 8,9% of the patients had complex genetic etiology involving two genes. Common variants of the healthy populations were evaluated within the scope of the study and it was found that the differences of variant frequencies between the patients and the control group were insignificant. The results of this study showed that copy number variations may not be a frequent factor for pancreatitis and performing next generation sequencing with gene panels increases the diagnosis rate significantly.

Key Words: Pancreatitis, Genetics, NGS, MLPA, PRSS1, SPINK1, CFTR, CTRC

This present work is supported by Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Projects Unit. Project Number: 2019-2726

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Pankreas	3
2.2.1. Pankreas Embriyolojisi ve Histolojisi	4
2.2.2. Pankreas Anatomisi	5
2.2.3. Pankreas Fizyolojisi	7
2.3. Pankreatit	10
2.3.1. Pankreatit Sınıflaması	10
2.3.2. Pankreatit Epidemiyolojisi	12
2.3.3. Pankreatit Etiyolojisi	13
2.3.4. Pankreatit Patofizyolojisi	14
2.3.5. Pankreatit Komplikasyonları	19
2.4. Pankreatitin Genetik Yönü	20
2.4.1. Pankreatit İlişkili Genler ve Moleküler Yolaklar	21
2.4.2. Kalıtsal Pankreatitlerin Klinik Özellikleri	28
2.4.3. Kalıtsal Pankreatitlerde Tedavi	29
2.4.4. Kalıtsal Pankreatitlerde Genetik Danışmanlık	31
2.5. Genetik Varyasyonları Saptamak İçin Kullanılan Yöntemler	32
2.5.1. Yeni Nesil Sekanslama	32
2.5.2. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu	36

2.6. Pankreatitte Genetik Tanı	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Çalışma Grubu	39
3.2. Olguların Klinik Bulgularının Değerlendirilmesi	41
3.3. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	42
3.3.1. Kullanılan Aletler	42
3.3.2. Kullanılan Malzemeler	43
3.4. Yöntem	44
3.4.1. DNA İzolasyonu	44
3.4.2. Yeni Nesil Sekanslama	44
3.4.3. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu	48
3.5. İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	51
4.1. Olguların Demografik Özellikleri	51
4.2. Olguların Klinik Özellikleri	52
4.3. Olguların Aile Öyküleri	55
4.4. Moleküler Analiz Sonuçları	57
4.4.1. Yeni Nesil Sekanslama Analiz Sonuçları	63
4.4.2. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu Analiz Sonuçları	87
4.5. Moleküler Sonuçların Klinik Özelliklerle Karşılaştırılması	89
5. TARTIŞMA	94
5.1. Moleküler Genetik Analizlerin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	94
5.1.1. <i>PRSSI</i> Varyantlarının Değerlendirilmesi	95
5.1.2. <i>SPINK1</i> Varyantlarının Değerlendirilmesi	96
5.1.3. <i>CTRC</i> Varyantlarının Değerlendirilmesi	96
5.1.4. <i>CFTR</i> Varyantlarının Değerlendirilmesi	97
5.1.5. Kompleks Genetik Etiyolojinin Değerlendirilmesi	98
5.1.6. Tanı Gruplarına Göre Varyantların Değerlendirilmesi	102
5.1.7. Toplumda Yaygın Gözlenen Varyantların Değerlendirilmesi	103
5.2. Genetik Varyasyonlarla Klinik Bulguların İlişkisinin Değerlendirilmesi	104
5.2.1. İlk Atak Başlangıç Yaşı ve Genetik Varyasyonların İlişkisi	104

5.2.2. Aile Öyküsü ve Genetik Varyasyonların İlişkisinin Değerlendirilmesi	107
5.2.3. Genetik Varyasyonlar ve Klinik Progresyon Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	110
5.2.4. Genetik Varyasyonlar ve Pankreatik Divisum Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
KAYNAKLAR	116
EKLER	
EK 1: HASTA DÖKÜMÜ	
EK 2: ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics; Amerika Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu
B	Benign
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CADD	Combined annotation-dependent depletion; Kombine açıklama bağımlı deplesyon
CASR	Calcium sensing receptor; Kalsiyum duyarlı reseptör
CEL	Carboxyl ester lipase; Karboksil ester lipaz
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Regülatörü
CLDN2	Claudin 2; Klaudin 2
CNV	Copy number variation; Kopya sayısı değişimi
CPA1	Carboxypeptidase A1; Karboksipeptidaz A1
CPA2	Carboxypeptidase A2; Karboksipeptidaz A2
CPB1	Carboxypeptidase B1; Karboksipeptidaz B1
CTRB1	Chymotrypsinogen B1; Kimotripsinojen B1
CTRB2	Chymotrypsinogen B2; Kimotripsinojen B2
CTRC	Chymotrypsin C; Kimotripsin C
DAMP	Damage-associated molecular pattern; Hasar ilişkili moleküler yapı
DANN	Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks; Nöral ağları kullanarak genetik varyantların zararlarının açıklanması
dk	Dakika
ERCP	Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi
ESWL	Extracorporeal shock wave litotripsi; Ekstrakorporeal şok dalga litotripsi
FATHMM	Functional Analysis Through Hidden Markov Models; Gizli Markov modelleriyle fonksiyonel analizler

FATHMM-MKL	FATHMM - multiple kernel learning; FATHMM - çoklu çekirdek öğrenme
FATHMM-XF	FATHMM - eXtended Feature; FATHMM - genişletilmiş özellik
gnomAD	The Genome Aggregation Database; Genom toplama veritabanı
GWAS	Genome wide association studies; Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları
IP ₃ R:	Inositol trisphosphate receptor; İnozitol trifosfat reseptörleri
İndel	Insertion and/or deletion; İnsersiyon ve/veya delesyon
LAMPs	Lysosome-associated membrane glycoproteins; Lizozom ilişkili membran glikoproteinleri
LB	Likely benign; Olası benign
LP	Likely pathogenic; Olası patojenik
LRT	Likelihood ratio test; Olabilirlik oranı testi
MAF	Minör allel frekansı
mg / dL	Miligram / desilitre
ml	Mililitre
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification; Multipl ligasyona bağlı prob amplifikasyonu
MODS	Multiple organ dysfunction syndrom; Multipl organ yetmezliği sendromu
MODY8	Maturity onset diabetes of the young type 8; Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet 8
MRCP	Magnetic resonance cholangiopancreatography; Manyetik rezonans kolanjiopankreatografi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; Aktive B hücrelerin nükleer faktör kappa hafif zinciri güçlendiricisi
Ngn3	Neurogenin-3; Nörogenin 3
P	Pathogenic; Patojenik
PCR	Polymerase chain reaction; Polimeraz zincir reaksiyonu

Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1; Pankretik ve duodenal homeoboks 1
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping; Polimorfizm fenotipleme
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer; Protein varyasyonu etki analizörü
PRSS1	Serine Protease 1; Serin Proteaz 1
PRSS2	Serine Protease 2; Serin Proteaz 2
Ptf1a	Pancreas specific transcription factor 1a Pankreasa spesifik transkripsiyon faktör 1a
REVEL	Rare exome variant ensemble learner; Nadir ekzom varyant topluluğu öğrenicisi
ROS	Reactive oxygen species; Reaktif oksijen ürünleri
rpm	Rounds per minute; dakikadaki devir sayısı
SAPE	Sentinel acute pancreatitis event; Sentinel akut pankreatit olayı
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant; Toleranttan intoleranta sıralama
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome; Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
sn	Saniye
SNV	Tek nükleotid değişimi; Single nucleotide variant
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal-type 1; Serin proteaz inhibitör Kazal-tip 1
STIM1	Stromal interaction molecule 1; Stromal etkileşim molekülü 1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha; Tümör nekroz faktör alfa
TP-IAT	Total pancreatectomy and islet auto-transplant; Total pankreatektomi ve adacık hücresi ototransplantasyonu
TRPV6	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6; Transient reseptör potansiyel katyon kanalı, altgrup V, üye 6
UPR	Unfolded protein response; Katlanmamış protein yanıtı
VUS	Variant of Unknown Significance; Önemi bilinmeyen varyant
°C	Santigrat derece
μ l	Mikrolitre

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Pankreas ve kanallarının anatomisi	6
2.2. Tripsin bağımlı protein aktivasyonu yolağı	8
2.3. Endokrin pankreasın kan glukoz homeostazında rolü	9
2.4. Pankreatit ilişkili genlerin patojenik varyantlarının etki mekanizması	26
4.1. Araştırmaya dahil edilen olguların cinsiyetleri ve başvuru yaşlarının dağılımı	51
4.2. Araştırmaya dahil edilen vakaların tanı sınıfları	52
4.3. İlk atak başlangıç yaşlarına göre olgu sayısının dağılımı	53
4.4. 14 nolu olguda MRCP ile saptanan pankreatik divisumun görüntüsü	54
4.5. Tüm gruplarda verilen klinik özelliklere sahip olguların yüzdesel dağılımı	55
4.6. 4 nolu olgunun pedigri analizi	56
4.7. 22 nolu olgunun pedigri analizi	56
4.8. Tespit edilen varyantların ACMG sınıflandırmasına göre oransal dağılımı	58
4.9. Yaygın varyantların pankreatit olgularında allelik dağılımı	59
4.10. Yaygın varyantların kontrol grubunda allelik dağılımı	59
4.11. 10 nolu olguda saptanan c.310C>G (p.L104V) varyantının görüntüsü	63
4.12. 10 nolu olgunun pedigri analizi	64
4.13. 13 nolu olguda tespit edilen c.365G>A (p.R122H) varyantının görüntüsü	65
4.14. 32 nolu olgudaki c.62A>C (p.D21A) varyantının görüntüsü	66
4.15. 34 nolu olguda saptanan c.364C>T (p.R122C) varyantının görüntüsü	67
4.16. 48 nolu olguda saptanan c.592-4C>T varyantının görüntüsü	68

4.17.	29 nolu olguda saptanan c.181T>C (p.C61R) varyantının görüntüsü	69
4.18.	Olgu 33'teki c.162delT (p.N56Mfs*39) varyantının görüntüsü	70
4.19.	Olgu 44'te saptanan c.194+2T>C varyantının görüntüsü	71
4.20.	Olgu 27'de saptanan c.703G>A (p.V235I) varyantının görüntüsü	72
4.21.	Olgu 21'de saptanan c.180C>T (p.G60=) değişiminin görüntüsü	73
4.22.	4 nolu olguda saptanan c.1516A>G (p.I506V) varyantının görüntüsü	74
4.23.	19 nolu olguda saptanan c.2605A>G; (p.I869V) varyantının görüntüsü	75
4.24.	21 nolu olguda saptanan c.3151A>G (p.I1051V) varyantının görüntüsü	76
4.25.	23 nolu olguda saptanan c.274-6T>C varyantının görüntüsü	77
4.26.	25 nolu olguda saptanan c.2991G>C (p.L997F) varyantının görüntüsü	78
4.27.	27 nolu olguda saptanan c.4220T>C varyantının görüntüsü	79
4.28.	31 nolu olguda saptanan c.869+2T>C varyantının görüntüsü	80
4.29.	44 nolu olguda tespit edilen c.358G>A varyantının görüntüsü	81
4.30.	38 nolu olguda tespit edilen IVS8-5T varyantının görüntüsü	82
4.31.	38 nolu olguda saptanan c.1408G>A (p.V470M) varyantının görüntüsü	83
4.32.	<i>CFTR</i> geni MLPA analizi normal olgunun görüntüsü	87
4.33.	<i>CFTR</i> geni MLPA analizi normal olgunun elektroferogram görüntüsü	87
4.34.	<i>CTRC</i> , <i>SPINK1</i> , <i>PRSSI</i> genleri MLPA analizi normal olgunun görüntüsü	88
4.35.	<i>CTRC</i> , <i>SPINK1</i> , <i>PRSSI</i> genleri MLPA analizi normal bir olgunun elektroferogram görüntüsü	88
5.1.	Klinik tanı gruplarına göre olgularda saptanan varyasyonların oranlarının karşılaştırılması	102
5.2.	18 yaş öncesinde semptomları başlayan 20 olguda saptanan genetik varyasyonların dağılımı	105

5.3.	Semptomları 18 yaş sonrasında başlayan 29 olguda saptanan genetik varyasyonların dağılımı	105
5.4.	Genetik değişim saptanan olgularda, ilgili genlerde semptom başlangıç yaşlarına göre olgu sayılarının dağılımı	106
5.5.	Patojenik varyant taşıyan olgulardaki varyanta göre ilk atak başlangıç yaşları	107
5.6.	Saptanan varyantların ilk atağını 35 yaş öncesi veya sonrasında geçiren olgulara göre dağılımı	107
5.7.	Aile öyküsü olan vakalar ile aile öyküsü olmayan vakalarda saptanan varyant oranlarının karşılaştırılması	108
5.8.	41 nolu olgunun pedigri analizi	109

TABLULAR

	Sayfa
2.1. Pankreatit sınıflaması ve tanı kriterleri	11
2.2. Pankreatit patofizyolojisinde temel mekanizmalar	15
2.3. ACMG'nin 2015 kılavuzuna göre NGS varyantlarının değerlendirilme kriterlerinin özeti	34
2.4. ACMG kılavuzuna göre kriterlerin varyant sınıflandırmada kullanımı	35
4.1. Çalışmamızda değerlendirilen olgular ve moleküler genetik incelemelerinin sonuçları	60
4.2. Olgularda saptanan <i>PRSSI</i> , <i>SPINK1</i> , <i>CTRC</i> ve <i>CFTR</i> genleri varyantlarının özellikleri	84
4.3. Toplumda yaygın bulunan varyantların özellikleri ve vakalarımızda tespit edilme durumları	86
4.4. Genetik risk faktörleri saptanan olguların genotipleri ve klinik özelliklerinin karşılaştırılması	89
4.5. Pankreatik divisumlu olguların genetik analiz sonuçları	91
4.6. Yapılan istatistiksel analizlerin sonuçları	93
5.1. Pankreatit olgularında genetik incelemeler yapılan çalışmalar ve ilgili genetik varyasyonların saptandığı olgu sayısı ile oranları	99
5.2. Geçmiş yayınlar ile mevcut çalışmada genetik risk faktörleri tespit edilen pankreatit olgularında pankreatik divisum bulunma oranlarının karşılaştırılması	112
5.3. Geçmiş yayınlar ile mevcut çalışmada pankreatik divisumlu pankreatit olgularında saptanan genetik varyasyon oranlarının karşılaştırılması	112

1. GİRİŞ

Pankreasın inflamasyonu ile karakterize olan pankreatit; gastrointestinal sistem ilişkili hastane başvurularının en önde gelen sebeplerindendir ve önemli oranda morbidite, mortalite ile sosyoekonomik yüke yol açar.

Pankreatit, semptomların başlangıç şekli ve sıklığına göre akut pankreatit, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit olmak üzere sınıflandırılarak incelenir. Bu alt tipler aslında klinik olarak birbirlerinden ayrı hastalıklar olsa da; yapılan çalışmalarda devamlılık gösteren bir klinik spektrum oldukları düşünülmektedir. Akut ve rekürren akut pankreatit olgularında etiyojiden en sık safra taşı ve alkol sorumlu tutulurken; kronik pankreatitte alkol ve sigara kullanımı ön plana çıkmaktadır. Bunlar dışında bütün alt gruplarda ilaç kullanımı, enfeksiyon, hiperkalsemi, hipertrigliseridemi, pankreatik kanal tıkanıklığına yol açan kitlesel lezyonlar ve genetik faktörlerin de etkisinden söz edilmektedir. İlk incelemelere rağmen altta yatan etiyojik faktörlerin tespit edilemediği pankreatit vakaları ise "idiyopatik pankreatit" olarak adlandırılır.

Multifaktöriyel ve multigenik bir hastalık olan pankreatitte bugüne kadar *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC*, *CFTR*, *CPA1*, *CLDN2*, *CEL* ve *CASR* genlerinin varyasyonları tespit edilmiş olsa da yayınlarda en çok *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinin patojenitesinin üzerinde durulmaktadır. Patojenik genetik değişimlere bağlı pankreatit oluşan olgularda kronik pankreatit ve pankreas kanseri gelişme riski artmıştır. Bu yüzden de genetik faktörlere bağlı pankreatit oluşan olgularda diğer risk faktörlerinin ortadan kaldırılması, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve ailelerin genetik danışmanlık alması açısından genetik analizlerin planlanması önem taşımaktadır.

Yakın zamanlarda pankreatit genetiği üzerine yapılan çalışmalarda akut pankreatit, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit tanılarıyla incelenen vakaların önemli oranında genetik varyantlar tespit edildiği bildirilmiştir. Ancak bugüne kadar hem kendi toplumumuzda hem de literatürde akut pankreatit, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatitli olguların tümüne yönelik hem dizi varyantları hem de kopya sayısı değişimlerinin birlikte değerlendirildiği çalışmalar bulunmamaktadır. Risk

genlerinin aynı anda hem dizi varyantları hem de kopya sayısı değişimleri açısından birlikte değerlendirilmemeleri idiyopatik pankreatit olgularında yüksek olasılıkla bazı genetik etiyoloji faktörlerinin gözden kaçırılmasına yol açmaktadır.

Çalışmamızda gözden kaçabilecek bu olguların da saptanması adına idiyopatik pankreatit tanısı alan olgularda *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinin yeni nesil sekanslama ile dizi varyasyonlarının ve MLPA analizi ile ekzon/tüm gen kopya sayısı değişimlerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızın sonuçlarıyla pankreatitin etiyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilceği, ilgili genlerin kopya sayısı değişimi ile pankreatit ilişkisinin daha sağlıklı bir şekilde incelenip literatüre katkıda bulunabileceği, pankreatitli olguların prognozuna ait ek bilgilerin edinilebileceği, patojenik değişim saptanan olguların önleyici tedavi hizmetlerinden veya etiyolojiye yönelik diğer tedavilerden faydalanabileceği, patojenik değişim saptanan olgulara kalıtımsal pankreatit ve ayrıca *CFTR* patojenik değişimi taşıyan olgularda kistik fibrozis açısından genetik danışmanlık verilebileceği ve gelecekte genetik değişim taşıyan olgularla yapılacak çalışmalara temel oluşturabileceği öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tarihte Büyük İskender'in ölümüne yol açan hastalık dahil olmak üzere bilinen bir çok önemli figürün yaşadığı rahatsızlık günümüzde pankreatite atfedilse de, modern tıpta pankreatit hakkında bilinen ilk sistematik çalışmalar Reginald Huber Fitz (1843-1913) tarafından 19. yüzyılda yapılmıştır (1, 2). Fitz 1889 yılında 53 pankreatit hastasının klinik özelliklerini bildirerek hastalığın gastroduodenal inflamasyon sonucu oluştuğunu savunmuştu (3). Ancak pankreatitin, pankreasın kendi salgıları ile yine kendisinin sindirimine yol açtığı teorisi daha sonraki yıllarda Chiari tarafından ortaya kondu (4). Pankreatite yatkınlık sağlayan genetik faktörlerin varlığı ise ilk olarak 1952 yılında M. W. Comfort ve A.G. Steinberg'in kronik pankreatitli bir aileyi tanımlamasıyla fark edildi (5). Genetik teknolojilerin hızla gelişmeye başlamasının ardından, 1996 yılında Whitcomb ve çalışma arkadaşlarının ailevi pankreatitlerle katyonik tripsinojen geninin ilişkisini ortaya koymalarıyla birlikte pankreatitle ilişkili ilk gen tanımlanmış oldu (6). Whitcomb ve ekibinin erken dönem çalışmalarının açtığı yol ve genetik teknolojilerin hızla ilerlemesiyle; her geçen gün pankreatit ilişkili daha fazla genetik yatkınlık faktörü tanımlanmakta ve günümüzde dahi genetik çalışmalar pankreatit patogenezinin aydınlatılmasında en çok umut vadeden alan olmaktadır (2).

2.2. Pankreas

Pankreas, endokrin ve ekzokrin kompartmanları sayesinde besin sindirimi ile glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan retroperitoneal bir salgı organıdır (7). Ekzokrin kompartmanın primer görevi besinlerin sindiriminden sorumlu enzimleri de içeren pankreatik sıvıyı üretip duodenuma iletmekken, endokrin kompartman daha çok glukoz homeostazı ile ilgili hormonları üretip kan dolaşımına salgılar (8). Vücudumuz için oldukça önemli olan bu salgıların üreten pankreasın sekretuar fonksiyonları nöroendokrin, endokrin, parakrin ve intraasiner mekanizmalar tarafından sıkı kontrol altındadır (8).

2.2.1. Pankreas Embriyolojisi ve Histolojisi

Pankreasın %95'inden fazlasını oluşturan ekzokrin ünite, besin sindirimini sağlayan zimojenleri üreten asiner hücreler ve bu enzimleri nötröle ederek duodenuma taşıyan sodyum bikarbonattan zengin sıvıyı salgılayan duktal epitel hücrelerinden oluşur (7). Piramid şeklindeki asiner hücreler bol miktarda düz endoplazmik retikulum içermeleri sayesinde amilaz, lipaz, ribonükleaz ve fosfolipaz gibi enzimleri içeren salgı granüllerini üretirler (9). Apikal membranları merkezde bir lümen oluşturacak şekilde gruplaşan asiner hücreler, salgılarını bu interselüler kanalcıklara boşaltırlar. Asiniler birleşerek lobülleri, interselüler kanalcıklar da birleşerek daha geniş kanalları ve sonrasında ana pankreas kanallarını oluşturarak ekzokrin salgıların duodenumla bağlantısını gerçekleştirirler (8). Pankreatit oluşumuna neden olan temel patofizyolojik olaylar pankreasın ekzokrin kompartmanını ilgilendirir (7).

Endokrin ünite ise glukoz homeostazı ile ilişkili peptitleri üretilen kan dolaşımına salgılayan Langerhans adacıklarından oluşur. (7). Langerhans adacıklarında kümelenmiş α -, β -, δ -, PP- ve ϵ - hücreleri sırasıyla glukagon, insülin, somatostatin, pankreatik polipeptit ve ghrelin hormonlarını salgırlar (7). Her adacığın iyi gelişmiş bir kapiller sistemi ve uyarıcı sinir lifi vardır (10). Morfolojik olarak ekzokrin hücrelerden ayrılan adacık hücrelerinin salgıları; humoral kontrol, hücreler arası iletişim ve nöral uyarılarla regüle edilir (11). Ayrıca endokrin hücrelerle ekzokrin hücreler arasında insulin-asiner ekseninde sıkı bir ilişki vardır (8).

İnsan pankreasının embriyolojik gelişiminde, pankreas ilk olarak 4. hafta civarında distal ön bağırsaktan köken alan dorsal ve ventral tomurcuklar şeklinde gözlenir (8, 12). Primitif bağırsak tüpünden *Pdx1* eksprese edilmesinden kısa bir süre sonra ön bağırsak epitelinden pankreas tomurcuğu oluşur ve pankreatik endodermden *Ptf1a* ekspresyonu başlar (13, 14). *Pdx1* ve *Ptf1a* eksprese eden multipotent progenitör hücreler pankreatik hücrelerin kökenini oluşturur ve bu hücrelerin sayısı erişkin pankreasın büyüklüğünü belirler (15). Ön barsağın vajinasyonu ile oluşumu tetiklenen dorsal pankreas tomurcuğu, multipotent progenitör hücrelerin proliferasyonu ile büyürken, ventral ön bağırsak epitelinden de ventral bağırsak tomurcuğu gelişmeye başlar (7). Pankreasın farklı anatomik bölgelerinin oluşumunu sağlayacak olan bu

tomurcuklar, ilerleyen dönemde mide ve duodenumun rotasyonu sırasında birleşirler (7, 8). Bu iki tomurcuğun birleşmediği durumlar pankreasın en sık konjenital gelişimsel anomalisi olan ve insanların %4-10'unda gözlenen pankreatik divisum oluşumuyla sonuçlanır (16, 17).

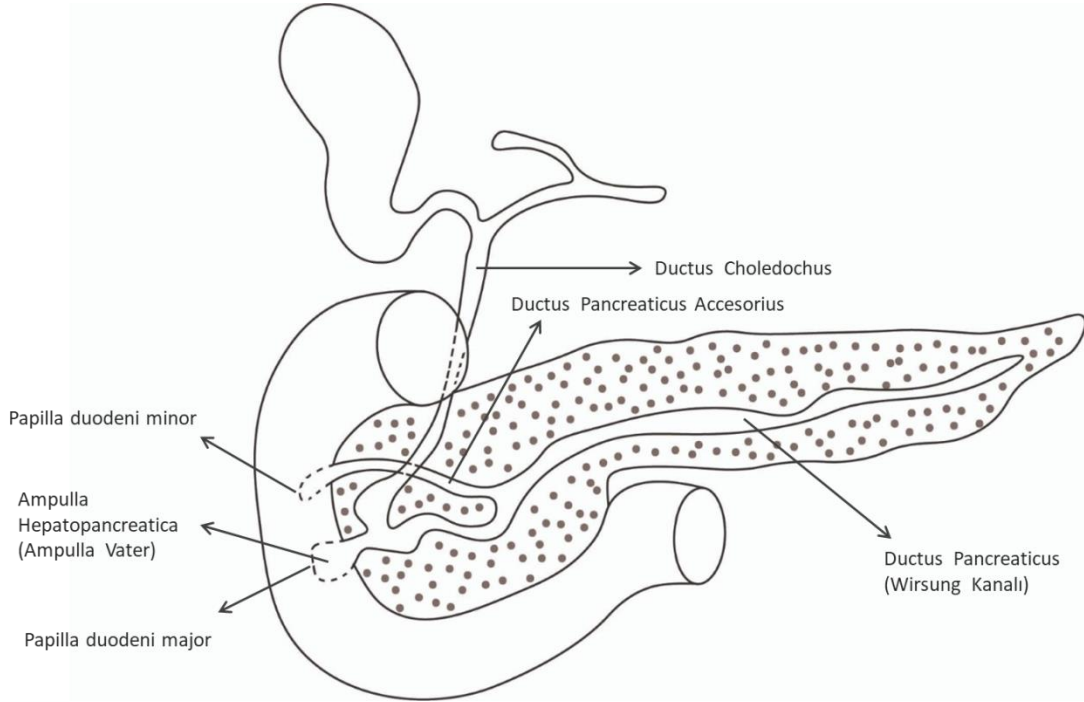
Tomurcuklardaki kök hücreler organogenezin devamında çok tabakalı bir epitel yapısı oluştururlar. Bu tabakalardan en içteki hücre grupları apikal polarite gösterirken, iç hücreler nonpolarlardır ve dış çeperdeki hücreler bazal polariteye sahiptir (7). Hücrelerin bu şekilde polarite göstermesi mikrolümenleri ve daha sonraki süreçte de lümenleri oluşturacak olan rozet yapılarının gelişimini sağlar (7). Mikrolümenler genişleyip birleşerek dallanmış luminal yapılardan oluşan bir epitelyal pleksusu oluşturur (7). Santral pleksusu çevreleyen periferal epitel bipotent gövde hücrelerinin sentrosiner hücreler ile uç hücrelere farklılaşmasıyla ana bir kanalın intralobüler ve interlobüler kanallara dallanması gerçekleşmiş olur (7).

Dallanma sırasında pankreatik epitelin santral pleksusu endokrin progenitörlerin bulunduğu bir *niche* görevi görür (7). Endokrin adacık hücrelerinin oluşumunun ana regülatörü olan *Ngn3* molekülü gibi endokrin progenitörler gestasyonun 8. haftasında zirve yaparlar ve 26-28. haftalardan sonra azalarak 35. haftada kaybolurlar (18-20). Buna bağlı olarak öncelikle 8. hafta civarında β - hücreleri saptanabilirken, glukagon ekspresyonu 9. haftada başlar (21-25). Onuncu hafta civarında endokrin hücrelerin kümelenmeye başlaması pankreatik kanalların olduğu dallanma evresine denk gelir ve 13. haftada gelişmeye başlayan adacıklar içerisinde endokrin hücreler gözlenebilirler (22, 26). Başlangıçta adacıkların farklı bölgelerinde yoğunlaşan α - ve β - hücreler 21. hafta civarında adacıklarda tamamen iç içe geçerler (7). Ekzokrin ve endokrin kompartmanların gelişimi intrauterin dönemde büyük oranda sağlansa da pankreasın tam matürasyonu doğumdan sonra tamamlanır (8).

2.2.2. Pankreas Anatomisi

Pankreas üst abdomende 1.-2. lumbal vertebra hizasında bulunan, 15-20 cm boyutlarında ve 100-150 g ağırlıklarında sekonder retroperitoneal bir salgı bezidir (8, 27). Pankreas; *caput pancreatis*, *collum pancreatis*, *corpus pancreatis* ve *cauda*

pancreatis olmak üzere 4 bölümden oluşur ve midenin arka yüzü, duodenum, kolon, aorta, dalak, sol böbrek ile sol böbrek üstü bezi gibi önemli anatomik yapılarla komşuluk yapar (8, 27).



Şekil 2.1. Pankreas ve kanallarının anatomisi

Pankreasın ekzokrin salgıları ventral tomurcuktan gelişen *ductus pancreaticus* (Wirsung kanalı) ve toplumun %41-52,5'inde bulunan *ductus pancreaticus accessorius* aracılığı ile duodenumun ikinci bölümüne akıtılır (28). *Ductus pancreaticus* pankreasın kuyruğundan başlar ve bezin baş kısmına gelince *ductus choledochus*'la bir araya gelir. Bu iki kanal bir araya gelip beraber aşağıya uzandıktan sonra bazen birleşerek, bazen de ayrı ayrı iki açıklıkla *papilla duodeni major*'a açılırlar. Bu iki kanalın duodenuma açılışı çok fazla varyasyon gösterir ancak genellikle duodenumun dışında veya duvarında *ampulla hepatopancreatica* (Ampulla Vater) denilen bir genişleme yaparak *papilla duodeni major*'e açılır. *Ductus*

pancreaticus accessorius ise ana kanal tıkalı olduğunda tek başına işlev görebilir ve salgıları *papilla duodeni major*'un 2 cm yukarısında bulunan *papilla duodeni minor*'e boşaltır (Şekil 2.1.) (27).

Pankreatik divisumlu olgularda ise dorsal tomurcuk kökenli kanal pankreasın büyük bir kısmının drenajını *papilla duodeni minor*'e akıtırken, ön tomurcuğun kanalı *corpus pancreatis*'in alt kısmını *papilla duodeni major*'e boşaltır (29).

2.2.3. Pankreas Fizyolojisi

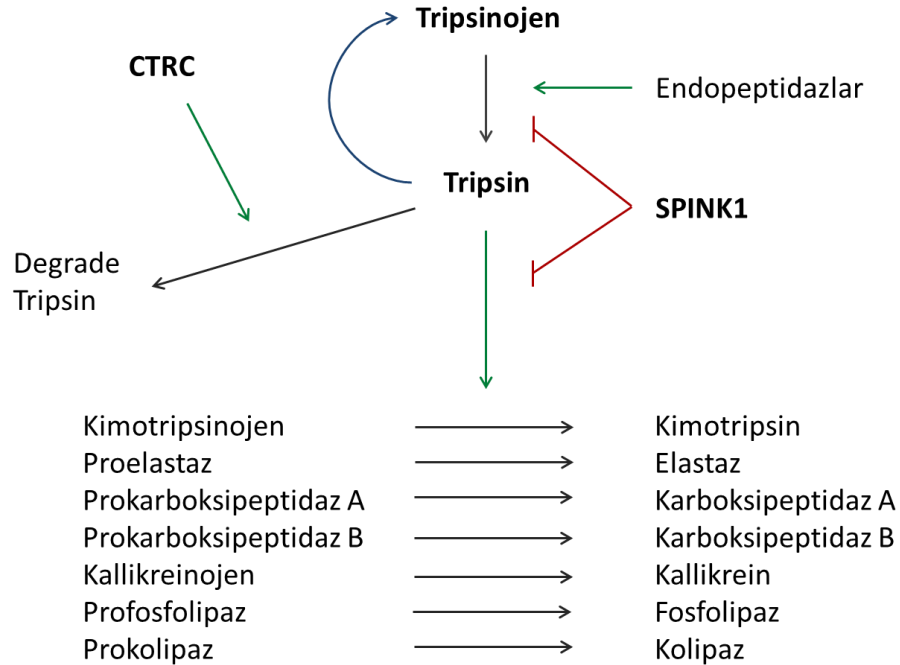
- Pankreasın Ekzokrin Fonksiyonları

Pankreatik asiner hücrelerden ribonükleaz, lipaz, amilaz, hidrolazlar ve ondan fazla tipte proteaz olmak üzere yirminin üzerinde farklı enzim türü salgılanır (30). Amilazlar karbonhidratların; lipaz, kolesterol esteraz ve fosfolipazlar ise yağların sindirimini sağlar (31). Proteinlerin sindiriminden sorumlu olan proteolitik enzimlerin ise pankreatik sıvıda en bol bulunanı tripsin öncülü olan tripsinojendir (32).

İnsanlarda tripsinojen; katyonik tripsinojen (~%50-70), anyonik tripsinojen (~%30-40) ve mezotripsinojen (~%2-10) olmak üzere üç izoformda sentezlenir (32). Asiner hücrelerden genellikle inaktif formda salgılanan bu enzimler duktal sistemden salgılanan sodyum bikarbonattan zengin bir sıvı ile duodenuma atılırlar (33). İnaktif olarak salgılanan tripsinojenin fizyolojik aktivasyonu duodenumda kimusun mukoza ile teması sonrası salgılanan serin proteaz endopeptidazlarla veya yine tripsin tarafından otoaktivasyon mekanizması ile sağlanır (31, 34). Tripsin duodenumda tümüyle ya da kısmen sindirilmiş olan proteinleri çeşitli büyüklüklerdeki peptitlere kadar parçalasa da, tek tek aminoasitlere kadar parçalama işlemi karboksipeptidazlar tarafından tamamlanır (31).

Pankreatik sindirim enzimlerinin hücre dışına salgılanmasında vagal sinir uyarımı ve humoral aktiviteye yanıtta ikincil haberci olarak Ca^{2+} görev alır (35, 36). Asetilkolin veya kolesistokinin uyarısı sonrası asiner hücre sitoplazmasında, özellikle de zimojen granüllerin yoğun olarak bulunduğu apikal bölgede tekrarlayan kısa ömürlü Ca^{2+} konsantrasyonu artışı olur (37). Lokal sitozolik Ca^{2+} sinyalleri

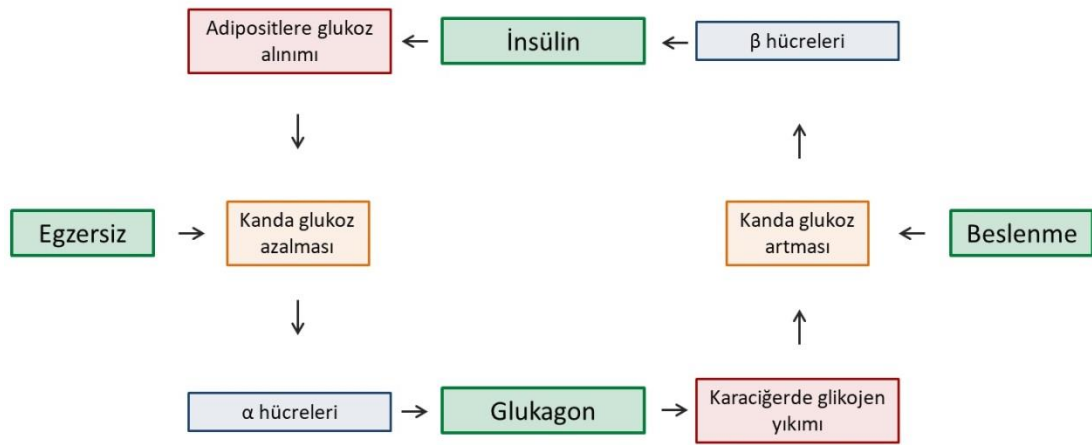
perigranüler mitokondrilerden ATP sentezlenmesini ve böylece de ekzositozla enzim salınımını sağlar (37, 38). Tripsinojenin tripsine aktiflenmesi de Ca^{++} bağlayıcı bölgesi bulunan 8- aminoasit N-Terminal ucunun bölünmesiyle olur (39). Artmış kalsiyum seviyeleri bu bölgenin stabilleşmesi ve tripsinin aktif enzim formuna bölünmesine yol açar (39). Aktifleşmiş tripsin, kimotripsinojen, proelastaz ve prokarboksipeptidaz B1 (CPB1) gibi enzimleri aktive eder (40). Prokarboksipeptidaz A1 (CPA1) ve prokarboksipeptidaz A2 (CPA2) ise tripsin ve kimotripsin C (CTRC)'nin ortak etkisiyle aktive edilir (Şekil 2.2.) (40).



Şekil 2.2. Tripsin bağımlı protein aktivasyonu yolağı

Tripsinojen henüz daha pankreas içerisindeyken tripsinin otoaktivasyonu veya lizozomal sistein proteaz katepsin B'nin katelizlemesi ile prematür aktivasyona uğrayabilir (33). Tripsinojenin pankreas içerisinde erken aktivasyonu Serin proteaz inhibitör kazal tip 1 (SPINK1)'in inhibisyonu ve CTRC ile katepsin L'nin tripsini degrade etmesi gibi mekanizmalarla engellenir (32, 41, 42). SPINK1, tripsinin aktif bölgesine bağlanarak tripsinin pankreatik asiner hücrelerdeki aktivasyonunun

%20'sini bloke eder (43). CTRC düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında katyonik tripsinin kalsiyum bağlayan ilmeğindeki Leu81-Glu82 peptit bağı kırarak tripsin aktivitesini hızla azaltır (32, 44). İleri yıkım ve inaktivasyon ise Arg122-Val123 peptit bağı kırılmasıyla sağlanır (44, 45). CTRC'nin primer fonksiyonu tripsinojen degradasyonunu artırmak olsa da, tripsinojen aktivasyon bölgesinin Phe18-Asp19 peptit bağında daha duyarlı olan kısa forma dönüşümünü stimüle ederek tripsinojen otoaktivasyonunu da artırabilir (45-47).



Şekil 2.3. Endokrin pankreasın kan glukoz homeostazında rolü

- Pankreasın Endokrin Fonksiyonları

Pankreas sindirim işlevine ek olarak glukoz, lipid ve protein metabolizmalarının düzenlenmesinde önemli rolleri bulunan insulin ve glukagon hormonlarını da salgılar (31). Langerhans adacıklarındaki α hücrelerinden salgılanan glukagon periferik dokulardaki glukozun kana geçmesini uyararak ağır hipoglisemiyi önlerken, β hücrelerden salgılanan insulin glukozun depolanmasını uyararak kan glukoz seviyelerini düşürür (48). Bu hormonlar arasındaki denge sayesinde uzamış açlık veya egzersiz gibi ekstrem durumlarda dahi kan glukoz düzeyleri korunur (Şekil 2.3.) (49). Endokrin sistemin fonksiyonları adrenalini gibi hormonlar, inkretinler ve

otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir (49). Endokrin pankreastan salgılanan hormonların anormal sekresyonu veya aktivitesine bağı olarak diabetes mellitus gibi hastalıklar oluşur (31).

2.3. Pankreatit

Pankreasın inflamasyonu ile karakterize olan pankreatit; gastrointestinal sistem ilişkili hastane başvurularının önde gelen sebeplerindedir ve önemli oranda morbidite, mortalite ile sosyoekonomik yüke yol açar (33, 50). Pankreatit semptomların başlangıç şekli ve sıklığına göre akut pankreatit, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit olmak üzere sınıflandırılarak incelenir (Tablo 2.1.) (51).

2.3.1. Pankreatit Sınıflaması

Akut pankreatit, pankreasın ani travmalarına karşı gelişen; lokal hasarın yanı sıra, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (*Systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) ve organ yetmezliklerine de yol açabilen ani inflamatuvar yanıtıdır (52, 53). Akut pankreatit hastaları sıklıkla abdominal ağrı, bulantı, kusma şikayetleri ile karşılaşılır ve hastaların hayat kalitelerinde belirgin bir gerileme gözlenir (53, 54). Akut pankreatitin tanısı: 1- akut pankreatit ile uyumlu abdominal ağrı (ani başlangıçlı, inatçı, şiddetli ve sıklıkla sırta vuran epigastrik ağrı), 2- serum amilaz ya da lipaz aktivitelerinin normalin en az 3 katı kadar artması, 3- görüntüleme yöntemleriyle (BT, MRG, transabdominal ultrasonografi) karakteristik bulguların saptanması kriterlerinden en az ikisinin sağlanması ile konulur (55). Akut pankreatit vakalarının yaklaşık %80'i lokal veya sistemik komplikasyonlar oluşmadan, hafif bulgularla seyreder (53, 55, 56). Orta şiddetteki akut pankreatitlerde geçici (<48 saat) organ hasarı oluşurken, ağır pankreatitler kalıcı organ yetmezliği ile karakterizedir (53, 55). Orta şiddette ve ağır pankreatitlerde pankreatik ve/veya peripankreatik nekroz gelişebilir ve nekrotik dokunun infekte olduğu vakalarda %15-35 gibi yüksek oranlarda mortalite gözlenebilir (53, 56).

Rekürren akut pankreatit ise, aralarında en az 3 aylık tam bir iyileşme periyodu bulunan 2 veya daha fazla ayrı akut pankreatit atağı olarak tanımlanır (51). Genellikle normal morfoloji ve fonksiyona sahip pankreasta kendini sınırlayan ödematöz değişiklikler olarak gözlense de, altta yatan kronik pankreatit kanıtları ilk atakta veya devam eden ataklarda saptanabilir (51).

Tablo 2.1. Pankreatit sınıflaması ve tanı kriterleri

Akut Pankreatit	<p>Üç kriterden en az ikisinin sağlanması:</p> <p>1- Akut pankreatit ile uyumlu abdominal ağrı (akut, inatçı, şiddetli ve sırta vuran epigastrik),</p> <p>2- Serum amilaz ya da lipaz aktivitelerinin normalin en az 3 katı kadar artması,</p> <p>3- Görüntüleme yöntemleriyle karakteristik bulguların saptanması.</p>
Rekürren Akut Pankreatit	<p>İki kriterin bir arada olması:</p> <p>1 - En az iki akut pankreatit atağı geçirmek,</p> <p>2 - Ataklar arasında klinik bulgular açısından tam bir iyileşme sağlanması.</p>
Kronik Pankreatit	<p>Tekrarlayan karın ağrısı ve serum amilaz/lipaz seviyelerinin en az 3 kat artmasına eşlik eden aşağıdaki kriterlerden herhangi biri:</p> <p>1- Ana pankreas kanalı veya yan pankreas kanalı dallarının daraldığına ya da genişlediğine radyolojik kanıt ve/veya pankreas parankiminde kalsifikasyonlar görülmesi,</p> <p>2- Kronik pankreatit açısından histolojik kanıt tespit edilmesi</p>

Kronik pankreatit ekzokrin, endokrin ve duktal hücrelerin kaybına yol açan kronik ve progresif inflamasyon, fibroz ve skar dokusu oluşumu ile karakterizedir (57). Kronik pankreatit tanısı; tekrarlayan karın ağrısı ve serum amilaz/lipaz seviyelerinin en az 3 kat artmasına eşlik eden 1- Ana pankreas kanalı veya yan pankreas kanalı dallarının daraldığına ya da genişlediğine radyolojik kanıt ve/veya BT ya da Manyetik Rezonans Kolanjiopankreatografi (MRCP)'de pankreas parankiminde kalsifikasyonlar görülmesi, 2- Endoskopik ultrasonografiyle veya cerrahi olarak alınan biyopsi örneklerinde kronik pankreatit açısından histolojik kanıt tespit edilmesi kriterlerinin birinin olması ile konulur (58). Kliniği erken dönemlerde tekrarlayan akut pankreatit atakları şeklinde seyrederken, geç evrelerde ağrı, skleroz, kalsifikasyon, diabetes mellitus ve steatore gibi bulgularla gider (58). Şiddetli abdominal ağrı, malnütrisyon, ekzokrin ve endokrin pankreatik yetmezlik bulguları gözlenir ve pankreas kanserine ilerleyebilir (57). Kronik pankreatit olgularında ortalama yaşam beklentisi normal popülasyona göre yaklaşık 8 yıl kısalmıştır (59).

Akut pankreatit ve kronik pankreatit birbirlerinden ayrı hastalıklar olsa da; yapılan çalışmalar akut, rekürren akut ve kronik pankreatitin devamlılık gösteren bir klinik spektrum olduğunu düşündürmektedir (57). Akut pankreatit olgularının %22'si rekürren akut pankreatite ilerlerken; rekürren akut pankreatit olgularının %36'sı, akut pankreatit olgularının da toplamda yaklaşık %10'u kronik pankreatite ilerler (60). Akut pankreatitin rekürren akut pankreatite ve nihayetinde de kronik pankreatite ilerlemesi genellikle alkol kullanımı veya altta yatan genetik faktörlerin etkisiyle tetiklenir (33).

2.3.2. Pankreatit Epidemiyolojisi

Akut pankreatit, akut hospitalizasyon gerektiren en sık gastrointestinal problemlerden biridir ve görülme sıklığında son yıllarda bir artış gözlenmektedir (56). Akut pankreatitin insidansı Avrupa toplumları için yılda 28,93/100.000 ve Amerika için 58,20/100.000 iken; global insidansı yıllık yaklaşık 33,74/100.000'tür (61). Erkeklerde insidans kadınlardan yaklaşık %10-30 daha fazladır (62, 63). Bunun yanında akut pankreatit sebebiyle her yıl Birleşik Krallık'ta 26.000'in, Amerika

Birleşik Devletleri'nde ise 275.000'in üzerinde hastane yatışı olmaktadır (53, 56). Akut pankreatitin global mortalite insidansı ise yılda 1,16/100.000 olarak görülmüştür (61). Rekürren akut pankreatitin insidansının da yıllık yaklaşık 8-10/100.000 olduğu düşünülmektedir (64).

Kronik pankreatit insidansı yılda yaklaşık 9,62/100.000 vaka iken prevalansının artan tanı ve tedavi imkanları ile 120-143/100.000 kadar yüksek olabileceği düşünülmektedir (58, 61, 65). Kronik pankreatitin yıllık mortalite insidansı yaklaşık 0,09/100.000'dir (61). Kronik pankreatit olguları ortalama 51-58 yaş aralığında tanı almaktayken, erken yaşlarda başlayan formları genelde genetik risk faktörleri ile ilişkilidir (58).

2.3.3. Pankreatit Etiyolojisi

Akut pankreatit ve rekürren akut pankreatit etiyojisinden en sık safra taşı/çamuru ve alkol sorumludur. Bunun yanında ilaç kullanımı, enfeksiyon, hiperkalsemi, ERCP, hipertrigliseridemi, travma, pankreatik kanal tıkanıklığına yol açan kitlesel lezyonlar ve genetik faktörlerin de etkisinden söz edilmektedir (66-68). Dünya çapında sıklığı artan obezitenin de kolelitiazis, hipertrigliseridemi ve diabetes mellitus gibi komplikasyonlarıyla akut pankreatit insidansının artışında etkili olduğu düşünülmektedir (68).

Kronik pankreatitte ise özellikle kronik alkol veya sigara kullanımı risk oluşturmakta, Batı ülkeleri ve Japonya'da vakaların %40-70'inde aşırı alkol tüketiminin (60-80 g etanol/gün) ana risk faktörü olduğu bildirilmektedir (58, 69). Genetik faktörler, özellikle *PRSSI*, *SPINK1*, *CFTR* ve *CTRC* genlerinin varyantları kronik pankreatit patogeneğinde çok önemli rol oynamaktadır (70). Sık bilinen bu genetik risk faktörlerinin yanında Alagille sendromu, Johanson-Blizzard sendromu, Pearson sendromu, Shwachman-Diamond sendromu ve Wilson hastalığı gibi nadir sendromların bir bulgusu olarak da rekürren akut pankreatitlere veya kronik pankreatitlere rastlanabilir (71). Bunların yanında hiperkalsemi, hipertrigliseridemi, otoimmün hastalıklar, obstrüktif pankreatit ve nadiren de enfeksiyonların etiyojide yer aldığı bilinmektedir (58).

Pankreatit olgularının %10-30'unda ilk aşamadaki kapsamlı incelemelere rağmen etiyojoloji belirlenemez ve bu vakalar "idiyopatik pankreatit" olarak adlandırılır (52). İdiyopatik pankreatit olgularının önemli bir kısmında da altta yatan patojenik genetik varyantların varlığı bilinmektedir.

Pankreatik divisumun pankreatit gelişimindeki rolü ise hala tartışmalıdır (72). Erken dönem çalışmalar pankreatik divisumun idiyopatik pankreatitli olgularda daha yüksek sıklıkta saptandığını göstermekteyken, daha güncel çalışmalarda bu ilişki gösterilememiş; dahası pankreatik divisum olgularının büyük çoğunluğunun asemptomatik olduğu ve pankreatik divisum varlığının alkolik pankreatit prognozunu etkilemediği de ortaya konmuştur (72-75). Pankreatik divisumlu pankreatit olgularında genetik varyasyonlara sık olarak rastlanması da, bu anatomik varyasyonun genetik varyasyonlara kofaktör olarak pankreatit riskini artırabileceği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur (72, 74, 76, 77).

2.3.4. Pankreatit Patofizyolojisi

Patofizyolojik ve biyokimyasal araştırmalar pankreatit patogenezinde bir yüzyıldan uzun bir süredir proteaz-antiproteaz dengesindeki etkilenmeyi göstermekte ve son iki dekattaki genetik çalışmalar da bu görüşü desteklemektedir (33). Güncel araştırmalar, uzun süredir bilinen prematür proteaz aktivitesinin akut dönemde asiner hücre sindirimi oluşturmaya ek olarak, erken proteaz aktivitesinden bağımsız gelişen ve özellikle aktive edilmiş B hücrelerinin Nükleer faktör kappa hafif zinciri güçlendiricisi (NFκB) yolağının anahtar rol oynadığı inflamatuvar yanıtın akut ve kronik pankreatit gelişiminde önemini göstermektedir (78). Pankreatit patogenezindeki hayvan ve hücre kültürü çalışmaları daha çok akut pankreatit için uygulanabilmiş olsa da, genel mekanizmanın kronik pankreatit işleyişinde de etkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 2.2.) (33).

Akut pankreatitin hücresel patogenezinde esas olarak kalsiyum sinyal yolağının patolojik uyarımı, mitokondriyal disfonksiyon, asiner hücrelerle makrofajlarda prematür tripsinojen aktivasyonu, endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış protein yanıtı (*unfolded protein response*, UPR) ve otofaji

mekanizmalarında gerileme yer alır (68). Alkol, nikotin, safra asitleri gibi toksinler bu mekanizmaları tetikleyerek akut pankreatit oluşumuna yol açarlar (68). Obstrüksiyona bağlı pankreatik kanalların iç basıncının artması, luminal asidifikasyon ve duktal hücrelerin safra asitlerine maruziyeti gibi intraduktal olaylar da indirekt olarak bu mekanizmaların tetiklenmesinde etkilidir (68). Bu tetikleyici etkenlere karşı asiner hücreler ve immün hücrelerin verdiği tepkilerle de inflamatuvar bir yanıt oluşturulur (68). Bölgesel seviyede peripankreatik yağ dokusunda sabunlaşma ve mezenterik lenflerin iskemi bağımlı etkisi de yakın zamanda fark edilen diğer mekanizmalardır (68).

Tablo 2.2. Pankreatit patofizyolojisinde temel mekanizmalar

Akut pankreatit patofizyolojisi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hüresel Mekanizmalar <ul style="list-style-type: none"> - Kalsiyum ilişkili mitokondriyal disfonksiyon - Prematür tripsinojen aktivasyonu - Otofaji, endoplazmik retikulum stresi ve UPR 2. İntraduktal Mekanizmalar 3. İmmün Mekanizmalar
Kronik pankreatit patofizyolojisi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fibroz-nekroz sekansı 2. Sentinel akut pankreatit olayı 3. Toksik moleküller ve metabolitlerin direk etkisi 4. Serbest radikallerin oksidatif strese yol açması 5. Duktal disfonksiyon

i. Akut Pankreatit Patofizyolojisinde Hücresel Mekanizmalar

- Kalsiyum ilişkili mitokondriyal disfonksiyon:

Kalsiyum vagal sinir uyarımı ve humoral aktiviteye yanıt olarak sindirim enzimlerinin salgılanmasında ikincil haberci olarak görev alır (35, 36). İntraselüler kalsiyum seviyesi normal pankreatik asiner hücre sekresyonunu kontrol etmenin yanında, pankreatit başlangıcı için de anahtar rol oynamaktadır (36, 79). Akut pankreatitin ana sebepleri olan patolojik konsantrasyonlardaki alkol, safra asitleri ve kan lipid düzeyi; endoplazmik retikulum ve asit depolarından masif kalsiyum salınımına, bu da inozitol trifosfat reseptörleri (IP₃R) ile ryanodin reseptörlerinin uyarılmasına neden olur (79-83). Özellikle IP₃R'ler aracılığı ile asit depolarından kalsiyum salınımı ve hücre içinde kalıcı kalsiyum konsantrasyonu artışı; intraselüler prematür tripsinojen aktivasyonu, NFκB aktivasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon ile yakından ilişkilidir (37, 68, 79, 84). Böylece kalsiyum toksisitesi pankreasın otosindirim ve nekroza gidişine neden olur (68, 79, 84).

- Prematür tripsinojen aktivasyonu:

Pankreas asiner hücrelerinden sentezlenen tripsinojen temelde duodenumda aktif formuna dönüşmekte, ancak bazı durumlar tripsinojenin pankreas içi aktivasyonuna yol açmaktadır. Proteazların prematür aktivasyonunda 3 farklı mekanizma bildirilmiştir: Tripsinojenin otoaktivasyonu, lizozomal proteazlarca aktivasyon ve koruyucu mekanizmaların kaybı (33).

- Otoaktivasyon: Tripsinojen kodlayan gendeki belli varyantlar tripsinojen otoaktivasyonunu stimüle ederek fizyolojik tripsin aktivasyonunu patolojik bir seviyeye çekebilirler (33). Bu durumun kronik pankreatite yol açtığı çok sayıda genetik ve fonksiyonel çalışmanın sağladığı kanıtlarla gösterilmiştir (33).

- Lizozomal Proteazlarla Aktivasyon: Pankreasa toksik etki gösteren maddeler, asiner hücrelerde lizozomal/sindirim enzimlerinin sentezini artırarak ve aynı zamanda mikrotübüllerin fonksiyonunu bozarak zimojen granüllerin apikal ekzositozunu azaltırlar, bunun sonucunda hücre içinde zimojen granülleri birikir (68, 85). Bu olaylar

kolokolizasyon denilen bir süreci aktifler ve zimojen granüllerle lizozomların füzyonuna neden olurlar (68, 86). Zimojen granüllerinin lizozomlarla füzyona uğramasıyla katepsin B tripsinojeni tripsine aktifler (87). Oluşan endoplazmik vakuoller hücre membranı ile birleşerek veya direk rüptüre olarak aktif tripsini hücre içine veya ekstraselüler alana boşaltabilirler (33, 88). Vakuollerden salınımının ardından tripsin asiner hücrelerde ve hücre dışında özindirime, katepsin B de nekropitozis oluşumuna yol açar (68, 89, 90). Hücre içi proteaz aktivasyonu ayrıca mitokondriyal sitokrom c'nin serbest kalmasına bağlı olarak kaspaz c aktivasyonuna yol açar ve apoptozis sürecini başlatır (68, 91).

- Koruyucu mekanizmaların kaybı: Prematür tripsin aktivasyonunu önleyen mekanizmaların kaybına dair bilinenler ise çok azdır (33). Hücrel tripsinin en güçlü inaktivatörü *SPINK1*'i kodlayan gendeki mutasyonlar, rekürren akut ve kronik pankreatit için bilinen en önemli risk faktörlerinden de olsa, bildirilen genetik varyantlar pankreatit riskinin artma sebeplerini net olarak açıklamamaktadır (33).

- Otofaji, Endoplazmik retikulum stresi ve UPR:

Pankreatotoksik maddeler protein sentezi ihtiyacında artışa ek olarak, mitokondriyal disfonksiyon ve otofajide azalmaya neden olur (68). Bazal düzeyde otofaji asiner hücrelerde protein sentezinin devamı ve endoplazmik retikulum stresinin önlenmesini sağlar (78, 92). Pankreatitin erken döneminde ise, lizozomal Katepsin L ile Katepsin B arasındaki denge bozulur ve bunun sonucunda prematür aktiflenmiş tripsin birikir (78, 93). Lizozomal hidrolazlarla lizozomal membran proteinlerinin (LAMPs) dengelerindeki bozulma otofaji sürecinin bozulmasına neden olur (78). Otofaji sürecinin bozulması da tripsinojen aktivasyonu, endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyal disfonksiyona yol açarak hücre hasarı ve ölümüne yakınlıkla sonuçlanır (68). Artmış protein üretim ihtiyacı ve biriken katlanmamış/yanlış katlanmış proteinler endoplazmik retikulum stresini artırır (68). Endoplazmik retikulum stresi durumunda asiner hücrelerde homeostazi yeniden sağlamak için otofajiyi başlatan UPR mekanizmalarındaki problemler de apoptotik yolağın aktive edilmesiyle sonuçlanır (68).

ii. Akut Pankreatit Patofizyolojisinde Duktal Mekanizmalar

Pankreatik sıvı sekresyonundan görevli transmembran kanalların toksik metabolitlerle fonksiyonlarının azalması bikarbonat salınımını azaltır. İntraduktal alanın asidifikasyonu kanal içi sıvı stazına neden olur ve intraduktal prematür proteaz aktivasyonu gerçekleşir (68, 94, 95). İntraduktal asidifikasyona bağlı sıvı stazının yanı sıra, intraduktal basınç artışı ve safra asitlerinin direk toksik etkisi de asiner hücre hasarı ile akut pankreatite gidişe yol açabilir (68, 96).

iii. Akut Pankreatit Patofizyolojisinde İmmün Sistemin Rolü

Inflamasyonun erken aşamalarında hücre içi Ca^{++} akışı sonrası intraasiner proteazlar ve NF κ B yolağının aktivasyonunun olması pankreatitin başlıca karakteristiğidir (33, 97, 98). Bu iki mekanizma hastalığın başlangıcında birbirine paralel olarak başlar ve birbirlerini güçlü bir şekilde etkilerler (33). NF κ B; proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ile adezyon molekülerinin gen ekspresyonunu düzenlemenin yanı sıra lökositlerin aktivasyonunda önemli role sahiptir ve immün sistemi modüle eden major elemandır (68, 99).

Asiner hücrelerin nekrozu ile açığa çıkan DNA, histonlar ve ATP gibi hasar ilişkili moleküler yapıların (DAMPs) ve sitokinlerin etkisiyle immün sistem uyarılır (33). Aktive edilen immün sistem pankreas hasarını artırır ve sistemik inflamasyona yol açar (33, 100-102). Pankreatit sırasında nötrofiller prematür tripsinojen aktivasyonunda rol oynar ve reaktif oksijen ürünleri (ROS) üreterek asiner hücrelerde oksidatif hasara neden olurlar (33, 68, 102). Pankreatite yanıt olarak tripsinojen aktivasyonu makrofaj hücrelerinde de gözlenir ve NF κ B yolağını aktifleyerek makrofajların proinflamatuvar etki göstermesine yol açarlar (68, 78, 101). Makrofajlar nekroptozisin indüklenmesi ve hasarlı pankreastaki nekrotik alanların temizlenmesinde görev alıp pankreas hasarını yavaşlatırlar (33, 101). Bununla beraber infiltre makrofajlar Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF α) salgılayarak pankreas hasarı ve proteaz aktivasyonuna da yol açarlar (100, 103). Monositler ayrıca diğer organlardaki monositleri de uyarak sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve multipl organ yetmezliği sendromlarına (MODS) gidişte rol oynarlar (68).

iv. Kronik Pankreatit Patofizyolojisi

Kronik pankreatit ise tekrarlayan akut pankreatitler ve kronik inflamasyonla pankreatik dokunun kalıcı hasara uğraması sonucu oluşur (58). Kronik pankreatit patofizyolojisi için 5 ana mekanizma hipotezlenmiştir (58). İlki olan fibroz-nekroz sekansı hipotezine göre tekrarlayan atakların iyileşmesi sırasında pankreatik stellat hücrelerin etkisiyle nekrotik doku fibrotik dokuya dönüşür (58, 104). Ancak bu hipotezin aksine, kronik pankreatit hastalarında nekrotik pankreatit öyküsü nadirdir (58). İkinci hipotez olan Sentinel akut pankreatit olayı (SAPE) bir “çift vuruş” modelidir (39, 105). SAPE modelinde pankreas hasarına bağlı oluşan akut veya subklinik akut pankreatitler ilk vuruş olarak kabul edilir. Kronik pankreatite yol açacak ikinci vuruş ise inflamasyonun normal süreci ve doku rejenerasyonundan sapma ile oluşur. İnflamatuvar cevap kalıcı hale gelmiştir, fibrozis ve kalıcı yapısal / fonksiyonel değişimler oluşur (39). Üçüncü hipotezde toksik moleküller ve metabolitlerinin direk toksik etkisinden şüphelenilmiştir (58, 106). Dördüncü hipotez asiner hücrelerdeki serbest radikallerin membran lipid oksidasyonu ve NFκB gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak oksidatif strese ve sitokin salınımına yol açtığını savunur (58, 100). Beşinci olarak da duktal disfonksiyonun protein tıkaçları ve obstrüksiyon oluşumuna neden olduğu savunulur (58, 104). Kronik pankreatit hastalarında duktal protein tıkaçlarına sık rastlansa da bunların pankreatitin sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu henüz netlik kazanmamıştır (58).

Akut pankreatit, nekrozlu ağır pankreatitli hastalar dışında reversibl seyrederken, kronik pankreatit irreversibldir, asiner hücrelerle adacık hücrelerinin yıkımı ile endokrin/ekzokrin yetmezlik, asiner/duktal metaplazi ile pankreas kanserine yatkınlık oluşur (58).

2.3.5. Pankreatit Komplikasyonları

Akut pankreatitin mortalitesi son yıllardaki tedavi imkanlarının da katkısıyla %1,6'lardan %0,8'lere kadar inmiştir (68, 107). Mortalite oranının azalmasına rağmen akut pankreatit ilişkili morbiditeler ve sekeller yaşam kalitesini önemli oranda etkilemektedir (54). Akut pankreatit hastalarında erken dönemde nekroz, kopuk

pankreatik kanal sendromu, venöz tromboz veya arteriyel/venöz psödoanevrizmalar gibi splanknik vasküler komplikasyonlar gelişebilir (68). Olguların büyük kısmında akut pankreatit sonrası geçici bir hiperglisemi tespit edilse de, yaklaşık %40'ında prediabet ve/veya diabetes mellitus; yaklaşık %25'inde ise ekzokrin pankreas yetmezliği gelişir (108, 109). Ekzokrin pankreas yetmezliği sindirim sorunları, steatore, vitamin/mineral yetmezlikleri ve metabolik kemik hastalığı ile sonuçlanabilir (109). Akut pankreatit olgularının %22'si rekürren akut pankreatite ilerlerken, yaklaşık %10'u kronik pankreatite ilerler (60).

Kronik pankreatit hastalarında biliyer ve duodenal obstrüksiyonlar, psödokistler, pankreatik fistüller, portal ven trombozu, pankreatik portal hipertansiyon, pankreatik assit, vasküler anevrizmalar ve kanama gelişebilir (58, 70). Kronik pankreatit olgularının tamamı ele alındığında, tanıdan sonraki 20 yıl içerisinde olguların yaklaşık %4'ünde pankreas kanseri gelişir (58). Herediter pankreatitlerde ise bu oran semptomların başlamasının ardından ilk 20 yılda %1,5, 40 yılda %8,5, 60 yılda ise %25,3 olarak saptanmıştır (58, 110, 111). Kronik pankreatitlerle pankreas kanserinin ilişkisi uzun dönemdir bilirse de, güncel yayınlarda akut pankreatitlerin pankreas kanserine yatkınlığa yol açması hakkında tartışmalı sonuçlar çıkmaktadır (112-114).

2.4. Pankreatitin Genetik Yönü

Pankreatit ile patojenik genetik değişimlerin ilişkisi her geçen gün daha fazla oranda gösterilmektedir. Pankreatitle ilişkilendirilmiş çoğu gen sindirim proteazları, tripsin inhibitörü veya pankreasta yüksek oranda eksprese edilen diğer proteinleri kodlar (33). Bugüne kadar *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC*, *CFTR*, *CPA1*, *CLDN2*, *CEL* ve *CASR* genlerinin patojenik değişimleri pankreatitlerle ilişkilendirilmiştir (33, 115). Ancak pankreatitin tek bir risk faktörü nedeniyle gelişmesi nadir bir durum olup, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit olgularında genellikle bir veya birkaç genin multipl varyantları ile çevresel risk faktörlerinin ortak etkisi bulunmaktadır (116). Bildirilen genlerden sadece *PRSSI*'in varyantları otozomal dominant kalıtılan herediter pankreatitle ilişkilendirilmekte, diğer genetik varyantların ise daha çok

pankreatite veya akut pankreatitin kronik pankreatite progresyonuna yatkınlığına yol açtığı düşünülmektedir (116).

2.4.1. Pankreatit İlişkili Genler ve Moleküler Yolaklar

Serin Proteaz 1 (*PRSSI*):

Pankreatit ilişkili genlerin ilk tespit edileni olan Serin Proteaz 1 (*PRSSI*)'in patojenik değişimleri otozomal dominant kalımlı Herediter Pankreatit'in en sık sebebidir (6). Katyonik tripsinojeni kodlayan *PRSSI* geni yaklaşık 3,6 kb büyüklüğündedir, 5 ekzon içerir ve 7q35'te; beş adet tripsinojen psödogeni, bir kalıntı gen ve anyonik tripsinojeni kodlayan *PRSS2*'nin bulunduğu lokusta lokalizedir (47, 117). Tripsin enziminin otoaktivasyon ve otolizis bölgeleri bulunur ve ortam pH'sı ile Ca^{2+} konsantrasyonuna göre kendini aktiflemeye veya yok etmeye meyillidir (44). Tripsinin bu bölgelerindeki küçük değişiklikler dahi normal tripsin aktivasyonunu bozarak prematür intrapankreatik tripsin aktivasyonuna ya da azalmış inaktivasyona yol açabilmektedir (44). Artmış aktiviteye sahip tripsinleri kodlayan *PRSSI* varyantları da tekrarlayan pankreas hasarı ve inflamasyonuna yatkınlığa neden olmaktadır (44).

PRSSI geninde 35'in üzerinde patojenik varyant pankreatit ile ilişkilendirilmişken, bunların en sık olarak saptananları p.R122H (~%65-70), p.N29I (~%20-25), p.R122C (~%3) ve p.N29T (<%1) dönüşümleridir (45, 47, 58). *PRSSI* patojenik varyantlarının etkileri ile ilgili çalışmalar göz önüne alındığında, bunların genellikle CTRC bağımlı tripsinojen degradasyonunu azaltarak katyonik tripsinojen aktivasyonunu uyardığı ya da direk olarak tripsin otoaktivasyonunu artırdığı gözlenmiştir (33). Tripsinojenin CTRC bağımlı yıkımla ilişkili Leu81 veya Arg122 bölgelerini etkileyen p.R122C ve p.R122H gibi *PRSSI* varyantları özellikle CTRC ilişkili tripsin degradasyonunu önlerken; p.N29I ve p.A16V N-terminal üretimini artırmak, CTRC ilişkili degradasyonu azaltmak ve direk etkiyle kendi aktivitesini artırmak gibi multipl mekanizmalarla tripsinojen otoaktivasyonunu artırabilmektedir (44, 45). p.R116C gibi bir grup *PRSSI* varyantının ise proteinde yanlış katlanmaya bağlı olarak; salınım azalması, hücre içi birikim ve endoplazmik retikulum stresini

artırmak gibi alternatif mekanizmalarla pankreatit yatkinlığına yol açtığı düşünülmektedir (118).

Serin proteaz inhibitör Kazal-tip 1 (*SPINK1*):

PRSSI'in tanımlanmasının hemen ardından Serin proteaz inhibitör Kazal-tip 1 (*SPINK1*) geni varyantlarının kronik pankreatitle ilişkisi kanıtlanmıştır (119, 120). *SPINK1* 5q32'de lokalize 4 ekzonlu bir gen olup, intrapancreatik prematür tripsin aktivasyonunu önleyen 56 aminoasitlik bir protein kodlar (121). *SPINK1* tarafından kodlanan Pankreatik sekretuar tripsin inhibitor (PTSI) proteini, potansiyel tripsin aktivitesinin yaklaşık %20'sini önleyerek pankreas dokusunu prematür tripsinojen aktivasyonundan korur (34). Batı toplumlarında c.101A>G (p.N34S), Çin'de ise c.194+2T>C dönüşümleri en sık gözlenenleri olmak üzere, 30'un üzerinde *SPINK1* varyantı bildirilmiştir (121, 122). p.N34S dünya genelinde %1-3 oranında görülen oldukça sık bir varyant olsa da, kronik pankreatit vakalarında görülme oranı çok daha yüksektir ve pankreatit patogenezinde rol oynamaktadır (39).

SPINK1 varyantlarının ilk akut pankreatit atağından ziyade rekürren akut pankreatitlerin ve kronik pankreatitlerin oluşumunda riske neden olduğu düşünülmektedir (39, 123). Yapılan çalışmalarda *SPINK1* varyant prevalansı ilk akut pankreatit atağını geçiren grupla kontrol grubunda eşit bulunurken, rekürren pankreatit atakları için *SPINK1* varyantlarının 19 kat riske yol açtığı bulunmuştur (39, 123). Ayrıca tropikal kronik pankreatitte 19, idiyopatik kronik pankreatitte 15, alkole bağlı kronik pankreatitte de 5 kat risk artışına yol açtığı tespit edilmiştir (39, 124). Avrupa orijinli popülasyonlarda yapılan 25 çalışmanın değerlendirildiği bir metaanalizde ise *SPINK1* geninin p.N34S varyasyonunun kronik pankreatit riskini 9 kata kadar artırdığı tespit edilmiştir (125). Bununla beraber *SPINK1* varyasyonlarının rekürren akut pankreatit veya kronik pankreatitle sonuçlanması için olgularda diğer pankreatit yatkinlık genlerinde de ek genetik değişimler olması gerektiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (39, 126).

SPINK1'deki genetik değişimlerin normal toplumda da sık görülmesi ve tek başlarına bulunmalarının pankreatit gelişimi için yeterli olmadığı izlenimini vermesi,

bu değişimlerin pankreatite neden olan etkenler değil, eşlik eden ek faktörlerin bulunması durumunda hastalığı modifiye eden faktörler olduklarını düşündürmüştür (121, 127). Ancak yapılan güncel çalışmalarda *SPINK1* ilişkili pankreatitlerde inflamasyonun daha erken yaşlarda başladığı gösterilmiş, ayrıca pankreas kanseri riski de artmış bulunmuştur (121, 128). Ayrıca Avrupa popülasyonlarındaki çalışmaların aksine, Çin'in Han popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada c.194+2T>C varyantına sahip bireylerde kronik pankreatit riski oldukça yüksek saptanmış, hatta bu olgularda hastalığın başlangıç yaşı ile klinik bulguların *PRSSI* varyantlarına sahip bireylerle benzer olduğu belirtilmiştir (122). p.N34S varyasyonunun fonksiyonel etkisini araştırmaya yönelik bir kaç çalışmada kronik pankreatit riskine yol açan moleküler mekanizmalar tam olarak ortaya konamamıştır (33). Bununla beraber kronik pankreatit olgularında proteinin erken sonlanmasına, başlangıç kodonunun değişimine, hücre içi katlanma ve salgılanma bozukluğuna yol açan varyantlar ile büyük heterozigot delesyonların tanımlanması, *SPINK1*'in fonksiyon kaybına yol açan değişimlerinin pankreatit açısından patojenik rol oynadığına kanıt olmaktadır (42).

Kimotripsin C (CTRC):

Kimotripsin C (CTRC) tüm insan tripsin ve tripsinojen izoformlarını yüksek spesifisite ile degrade eden minor bir kimotripsindir ve tripsinojenin prematür aktivasyonunu önler (32). 1p36.21'de lokalize, 8 ekzonluk, yaklaşık 8,2 kb büyüklüğündeki *CTRC* geni tarafından kodlanır ve bu genin fonksiyon kaybına yol açan varyasyonlarının pankreatit ile ilişkisi 2008 yılında tanımlanmıştır (129, 130). *CTRC* varyantları farklı toplumlarda farklı sıklıklarda gözlenmektedir (131). Başlangıçta *CTRC* varyantlarının kronik pankreatitte daha küçük bir rol oynadığı düşünölmüşse de, sonrasında gelen çalışmalarda c.180C>T (p.G60=) dönüşümünün olguların %30'undan fazlasında bulunduğu ve kronik pankreatitte en sık rastlanan risk faktörlerinden biri olduğu ortaya konmuştur (131, 132). Ayrıca varyantın heterozigot konumdayken pankreatit riskini 2,5 kat, homozigot durumdayken de 10 kata kadar artırdığı tespit edilmiştir (132). Ancak yapılan çalışmalar bu varyantın kronik pankreatit riskini artırsa da rekürren pankreatit riskine yol açmadığı sonucuna ulaştırmaktadır (131). c.180C>T (p.G60=) varyantının etki mekanizması tam

bilinmezken, bu değişimin anahtar düzenleyici roldeki elementleri sekteye uğraması muhtemeldir (131). Diğer *CTRC* varyantlarının ise tripsinojen degradasyon aktivitesinde azalma, tamamen inaktif protein üretimine yol açma, endoplazmik retikulum stresini artırarak hücre içi katlanma bozukluğuna ve degradasyon artışı ile azalmış protein sentezine yol açarak etki gösterdiğini düşündüren çalışmalar bulunmaktadır (42, 133, 134). Ayrıca *CTRC* varyantları özellikle sigara kullanan bireylerde daha fazla risk artışına yol açmaktadır (131).

Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Regülatörü (*CFTR*):

CFTR geni 7q31.2'de lokalize, 27 ekzonluk ve yaklaşık 250 kb büyüklüğünde negatif yüklü iyon transportundan sorumlu ATP bağımlı kaset taşıyıcı protein kodlayan bir genidir (135-138). Bu iyon kanalının fonksiyon görememesi durumunda negatif yüklü klor iyonunun yanı sıra, su moleküllerinin de transportu ile ilgili problemler yaşanmakta; bu da özellikle proteinin eksprese edildiği solunum yolları, sindirim sistemi, üreme sistemi ve ekzokrin bezlerde oldukça yoğun ve visköz mukus oluşumu ile sonuçlanmaktadır (138, 139). *CFTR* geni beyaz ırkın en sık otozomal resesif genetik hastalıklarından olan kistik fibrozisin yanı sıra, otozomal resesif konjenital vaz deferens agenezisi, otozomal dominant idiyopatik pankreatit, kronik rinosinüzit ve otozomal dominant bronşiektazi gibi klasik olmayan kistik fibrozis fenotipleri ile de ilişkilidir (138).

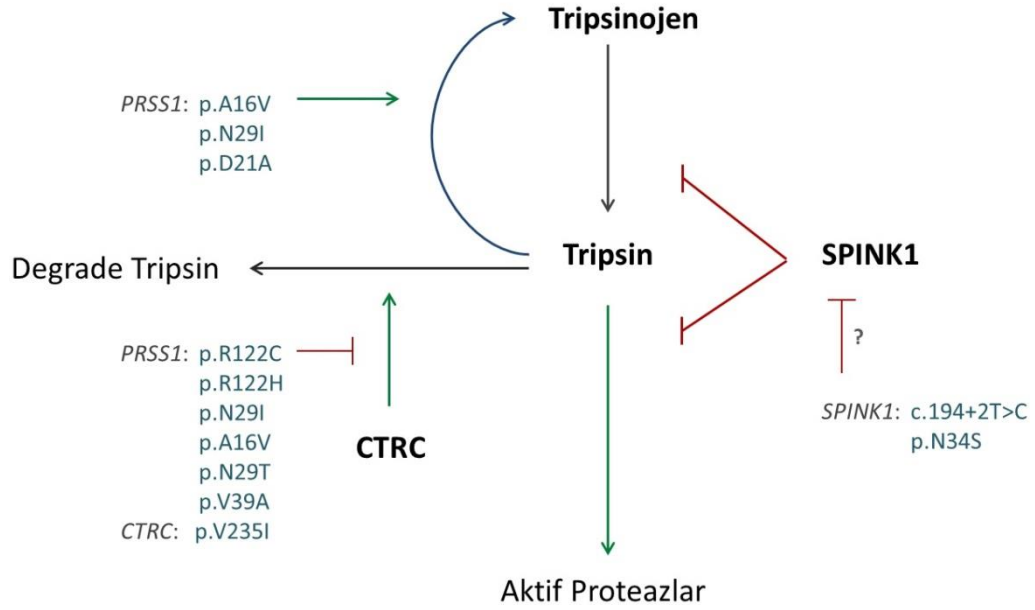
Heterozigot veya birleşik heterozigot *CFTR* varyantlarının kronik pankreatit ilişkisi 1998 yılında yayımlanan iki araştırmayla ortaya konmuştur (140, 141). *CFTR* geninin patojenik değişimleri sonucu pankreatik kanallarda *CFTR* ekspresyonunun azalmasının; daha visköz ve proteinden zengin pankreatik sıvı oluşumunun yanı sıra, lümen içi pH'ı artırarak ve pankreatik enzimlerin atılımını azaltarak obstrüksiyonlara, taş oluşumuna ve organ hasarına yol açtığı düşünülmektedir (139). *CFTR* geninin 2000'in üzerinde varyantı tespit edilmişken, bunların önemli bir kısmının klinik ve fonksiyonel etkileri net bilinmemektedir (39). Genotip-fenotip ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda paradoksik olarak hafif kistik fibrozis fenotipiyle ilişkili varyantların pankreatit riskini daha çok artırdığı tespit edilmiştir (142). Ağır bir kistik fibrozis

fenotipine yol açan p.F508del varyantı heterozigot durumda iken kronik pankreatit için daha küçük bir risk artışına yol açarken (OR: 2.5), daha hafif klinikten sorumlu bir varyant olan p.R117H kronik pankreatit riskini yaklaşık 4 kat artırmaktadır (33). Yine kistik fibrozise yol açmayan varyantlar geçmişte benign değişimler olarak değerlendirilmiş olsalar da, CFTR fonksiyonunu azaltarak erkek infertilitesi ve pankreatit gibi CFTR-ilişkili hastalıklara yol açabilirler (138). p.R117H, p.R74Q, p.R75Q, p.R170H, p.L967S, p.L997F, p.D1152H, p.S1235R ve p.D1270N varyantları klasik kistik fibrozise yol açmadıkları halde kronik pankreatitle ilişkilendirilmiş varyantlara örnektir (143). Güçlü ve zayıf *CFTR* varyantlarının birleşik heterozigot durumda birlikte bulunması ise kronik pankreatit için çok güçlü risk artışına sebep olur ve hatta pankreatiti oluşturan ana etken olarak dahi kabul edilebilir (144, 145).

Yakın zamandaki çalışmalar sık gözlenen polimorfik *CFTR* varyantlarının da kronik pankreatit riskiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. 2020 yılında yayınlanan bir metaanalizde kistik fibrozise yol açmadığı bilinen p.V470M allelinin kronik pankreatit riskini artırabileceği bildirilmiştir (146). Yine, *CFTR* geninin intron 8 *splice* kabul bölgesinin yakınlarında bulunan 3 majör polimorfik dizi varyantı (5T, 7T, 9T) arasında 5T alleli bu *splice* kabul bölgesinin en elverişsiz kullanımı ile ilişkilidir (147, 148). Bu da *CFTR* transkriptlerinin büyük bir kısmının ekzon 9'u içermemesine yol açar (147, 149). Ekzon 9 içermeyen CFTR proteini matürasyona uğrayamaz ve hücre apikalinde klor kanalı olarak fonksiyon göremez (147, 150, 151). 5T alleli toplumda oldukça sık rastlanan bir varyant olsa da allel frekansında artma, kronik idiyopatik pankreatit de dahil olmak üzere *CFTR* ilişkili hastalıklarda bildirilmiştir (140, 141, 147). Güncel çalışmalarda ise sık gözlenen bu polimorfik *CFTR* varyantının kronik pankreatitteki rolü tartışmalı hale gelmiş ve verilerin çoğunluğunun bu varyantların pankreatit ilişkisini desteklemediği öngörülmüştür (139). Bu allellerin kronik pankreatit üzerine etkisinin netleştirilebilmesi için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

CFTR varyantları pankreatit gelişimi için pankreatik sıvı akışını bozan sigara kullanımı ya da pankreatik divisum gibi etkenlerle sinerjistik etki gösterirler (39, 74, 152). Ayrıca *CFTR* ve *SPINK1* varyantlarının bir arada bulunmasının rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit gelişim riskini belirgin artırması, *CFTR*

disfonksiyonunun tripsin hasarı bağımlı yolakla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (126, 153). Geçmiş yıllarda pankreatit etiyolojisinde yer aldığı düşünülen pankreatik divisumla ilgili yapılan araştırmalarda ise, pankreatik divisumun tek başına pankreatit için risk yaratmadığı, ancak özellikle *CFTR* geninin patojenik değişimleri ile bir arada bulunduğu pankreatit riskini artırdığı hipotezi ortaya atılmıştır (74).



Patojenik *CFTR* Varyantları: İntraduktal kanal fonksiyonlarında bozulma

Şekil 2.4. Pankreatit ilişkili genlerin patojenik varyantlarının etki mekanizması

Diğer Genler:

Pankreatit ile ilişkisi en çok araştırılmış ve en net ortaya konmuş genler *PRSS1*, *CFTR*, *SPINK1* ve *CTRC* olsa da, bu 4 genin varyasyonları dışındaki genetik değişimlerin de pankreatitle ilişkisi keşfedilmektedir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada Karboksipeptidaz A1 (*CPAI*) geni varyasyonlarının özellikle erken başlangıçlı kronik pankreatitle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir (154). Araştırmacılar *CPAI* varyasyonlarının tripsin aktivitesini artırmaktan ziyade, protein

katlanma bozukluklarına bağlı artmış endoplazmik retikulum stresi ile pankreatit riskini artırmış olabileceğini belirtmiştir (154). Patojenik *CPA1* varyantlarının büyük bir kısmı toplumda düşük sıklıkta gözlenirler ve genellikle sporadik kronik pankreatitle ilişkilidirler (33).

Yine 2015 yılında, gençlerde görülen erişkin tipi diyabet 8 (MODY8) 'den sorumlu olan Karboksil ester lipaz (*CEL*) geninin komşu psödogeni olan *CELP* ile beraber oluşturduğu *CEL-HYB* hibrid allelinin idiyopatik kronik pankreatitli olgularda daha sık olarak bulunduğu fark edilmiştir (155). *CEL-HYB* ekspresyonu yapılan hücre kültürlerinde protein katlanma bozukluğu mekanizmasına uyumlu bir şekilde lipolitik aktivitenin gerilediği, sekresyonun azaldığı ve belirgin hücre içi birikim sonucu otofajinin indüklendiği gösterilmiştir (155). Asya toplumlarında *CEL-HYB* alleleline rastlanılmamış, bu allelin kronik pankreatit için etnik spesifik bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (156).

Kimotripsinojen B1 (*CTRB1*) – Kimotripsinojen B2 (*CTRB2*) lokusundaki 7 ekzonlu bu iki oldukça benzer sekansa sahip kimotripsin geni birbirlerine ters yönde transkripte edilirler (157). Bu bölgede bulunan 16,6 kb'lık bir inversiyon *CTRB1* ve *CTRB2*'nin ekspresyonunu azaltarak tripsinojen degradasyonunu etkiler (157). Yine Avrupa toplumlarında kronik pankreatit için belirlenmiş bu *CTRB1-CTRB2* risk alleleline Asya toplumlarında rastlanmamıştır (157, 158).

Bunlardan başka genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile Klaudin 2 (*CLDN2*) geni varyantlarının (159) ve Amerika ile Fransa'da yapılan iki çalışmada kalsiyum duyarlı reseptör (*CASR*) geni varyantlarının pankreatitle ilişkili olabileceği bildirilmişse de, bu iki genin patojenitesini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (160, 161). Ekzokrin pankreasta Ca^{2+} reabsorbsiyonunda önemli bir role sahip bir kanal proteinini kodlayan transient reseptör potansiyel katyon kanalı, altgrup V, üye 6 (*TRPV6*) geninin varyantlarının kronik pankreatite yatkınlık sağlayabileceği şüphesi de güncel yayınlarda belirtilmiştir (162, 163). Yine Ca^{2+} metabolizmasında önemli bir yere sahip stromal etkileşim molekülü (*STIM1*) geninin de kronik pankreatite yatkınlıktan sorumlu olabileceğini düşündüren çalışmalar mevcuttur (163, 164).

PRSSI geni ile %90 homoloji gösteren ve bu sebeple pankreatitle ilişkili olabileceğinden şüphelenilmiş serin proteaz 2 (*PRSS2*) geninin patojenik değişimleri bugüne kadar kalıtsal pankreatitle ilişkilendirilmemiştir (42). Bununla beraber, çeşitli yayınlarda toplumda yaklaşık %5 sıklığında bulunan *PRSS2* geninin p.G191R varyantının kronik pankreatite karşı koruyucu etkide bulunabileceği bildirilmiştir (165-167).

2.4.2. Kalıtsal Pankreatitlerin Klinik Özellikleri

Hereditör pankreatit, bir ailede iki veya daha fazla nesilde pankreatitli iki ve üstü olgunun olması; veya *PRSSI* geninin patojenik varyantlarına bağlı nesiller boyu kalıtılan pankreatitler olarak tanımlanır (11, 115). Ailevi pankreatit ise belli bir ailede genel toplumdaki daha yüksek sıklıkta pankreatitli vaka bulunması durumu için kullanılan daha geniş bir tanımdır (115).

PRSSI'e bağlı oluşan hereditör pankreatitin Batı ülkeleri ve Japonya'da prevalansı yaklaşık 0,3/100.000'dir (168, 169). En sık saptanan *PRSSI* varyantı olan p.R122H'a sahip çoğu olguda rekürren akut pankreatit atakları çocukluk döneminde, ortalama 10 yaş civarında başlar. Ancak rekürren akut pankreatitler gelişmeden direkt kronik pankreatitin geliştiği olgular da bulunmaktadır (111, 116). p.R122H'a sahip olgularda kronik pankreatit daha ağır klinikle seyreder ve endokrin/ekzokrin yetmezlik belirgin olarak daha sık saptanır (115). Ayrıca p.R122H taşıyıcılarında, patojenik değişimi maternal kalıtılan olgularda ve kadınlarda klinik bulguların başlama yaşı daha erkendir (111, 168). Kronik pankreatit genç erişkinlikte başlarken pankreas kanseri riski 5. dekattan itibaren artmıştır (116). Olguların %60'ından fazlasında pankreatik kalsifikasyonlar ile duktal anomaliler gibi kronik pankreatitin görüntüleme bulguları saptanır ve kalsifikasyonlar ortalama 22-25 yaşlarında belirgin hale gelir (170). Pankreas kanseri gelişimi için en yüksek risk, 70 yaşına kadar pankreas kanseri gelişim riskinin 53 kat artmış olduğu hereditör pankreatitli vakalar için bildirilmiştir (115). Hereditör pankreatitli olguların 70 yaşına kadar yaklaşık %60,2'sinde malabsorbsiyon, %68,6'sında diabetes mellitus ve %18,8-40'ında pankreas kanseri gelişir (110, 111).

Toplumda sık olarak rastlanan *SPINK1* geni varyantları pankreatit riskinde belirgin bir artışa yol açsalar dahi, olguların yalnızca yaklaşık %1'inden azında pankreatit gelişimi beklenir (115). Birden fazla patojenik değişim taşıyan olgularda fenotip *PRSSI* ilişkili herediter pankreatite benzeyebilir (115). Ancak Çin'de yapılan çalışmalar, Batı'daki araştırmaların aksine c.194+2T>C varyantına sahip olguların kliniğinin herediter pankreatitlere benzediğini göstermektedir (122). *SPINK1* geninin varyantlarının önceleri pankreas kanseri ile ilişkisi olmadığı düşünülmekteyken, güncel veriler bir korelasyon olabileceğini göstermektedir (121, 128, 171).

Pankreatit ilişkili *CFTR* geni varyantlarından özellikle bikarbonat kanal defektine yol açanlar erkek infertilitesi ve kronik sinüzit gibi nonklasik kistik fibrozis fenotipleri ile de oldukça sık olarak ilişkilidir (143). p.F508del, p.W1282X, p.I507del, p.S549R patojenik değişimlerinin de pankreas kanseri için hafif risk artışına yol açtığı saptanmakla birlikte, diğer varyantlar için böyle bir risk tespit edilmemiştir (171). *CTRC* ve *CEL* genlerinin varyantları ile pankreas kanseri gelişimi riski arasında da bir ilişki kurulamamıştır (171-174).

Patojenik genetik değişim taşıyan olgularda genel olarak hastalık ve hastalıkla ilişkili pankreatik taşlar, diabetes mellitus, steatore gibi komplikasyonların başlangıç yaşı belirgin olarak daha erken görülmüştür (122). Altta patojenik genetik değişimlerin saptandığı pankreatit olgularında kronik pankreatit ve pankreas kanseri gelişimi riski de genel olarak artmıştır (110, 175, 176).

2.4.3. Kalıtsal Pankreatitlerde Tedavi

Akut pankreatitin erken dönem tedavisinde amaç kaybedilen sıvının yerine konması ve ağrının kontrolüdür (56). Atak tedavisi sonrasında ise olgularda safra taşı/çamurunu dışlamak için abdominal/endoskopik ultrason işlemleri planlanmalı, hastalara sigara/alkolden kaçınmaları ve endokrin/ekzokrin pankreas yetmezliği açısından değerlendirilmeleri önerilmektedir (56). Pankreatit patogenezinin aydınlatılmasıyla beraber asiner hücrelere kalsiyum girişini engelleyen veya mitokondriyal fonksiyonların bozulmasını önleyen yeni moleküller keşfedilmiştir (37, 68, 177-179). Deneysel akut pankreatit modellerinde faydalı oldukları görülen bu

moleküller akut pankreatit tedavisinin geleceğinde umut vaat edicidirler (37, 68, 177-179).

Akut pankreatitin aksine kronik pankreatit muhtemelen rezolüsyona uğramaz, ancak ilerleyişi yavaşlatılabilir ve semptomları azaltıcı düzenlemeler yapılabilir (58). Bu yüzden kronik pankreatit tedavisinde asıl amaç ağrı kontrolü, ekzokrin/endokrin yetmezlik tedavisi ve hastalığın progresyonu ile olası komplikasyonları önleyerek hastanın hayat kalitesini yükseltmektir (58). Alkol ve sigara gibi risk faktörlerinin kaldırılmasının yanında, aşırı yüksek düzeyde protein ve yağ içeren gıdalardan kaçınılması, düzenli egzersiz yapılması önerilir (70). Ekzokrin yetmezlik için pankreatik enzim replasman tedavisi ve emilim bozukluğuna bağlı eksikliği saptanan besin maddelerinin yerine konması, endokrin yetmezlikte de hem hiperglisemi hem de hipoglisemiden koruyucu tedaviler gereklidir (58, 70). Pankreatik kanal taşları ve striktürleri gibi sorunlar genellikle stent, ERCP, Ekstrakorporeal şok dalga litotripsi (ESWL), cerrahi gibi invazif yöntemlerle tedavi edilir (58).

Patojenik genetik değişimlere sahip olgulara önerilecek gerçek spesifik bir tedavi bulunmamasına rağmen; kronik pankreatit, endokrin ve ekzokrin pankreas yetmezliği ve pankreas kanseri gibi komplikasyonların gelişimini önlemek adına sigara ve alkol kullanımı gibi diğer risk faktörlerini ortadan kaldırmak en önemli tedavi aşamalarındandır (52, 170). Kronik pankreatit gelişmiş olgularda ise total pankreatektomi ve islet hücresi transplantasyonu (TP-IAT) uygulamasıyla β hücresi fonksiyonları kaybedilmeden kronik ağrı kontrol altına alınabilir ve pankreas kanseri gelişimi riskinin önüne geçilebilir (180, 181). Pankreatik inflamasyonu azaltıcı cerrahiler ve alkol kullanımının kısıtlanmasının da kronik pankreatit hastalarında pankreas kanseri gelişimi riskini azalttığı gösterilmiştir (182).

Ayrıca genetik etiyolojisi belirlenmiş hastalar yakın gelecekte hedefe yönelik tedaviler açısından (CFTR modülatörleri veya *PRSSI* varyantlarında kalsiyum kanal blokörleri) değerlendirilebilecektir (52, 183). Bunlardan ilk olarak *CFTR*'nin p.G551D varyantı için üretilen Ivacaftor molekülü yeni bir çağ açmış ve kişiselleştirilmiş tıbbi tedaviler ile diğer genetik hastalıkların tedavileri için umut verici olmuştur (184). Yapılan araştırmalar Ivacaftor kullanan olgularda solunum fonksiyonlarının yanı sıra pankreas fonksiyonlarında da iyileşme olduğunu ortaya koymuştur (184). CFTR

modulatorlerinin ayrıca rekürren akut pankreatitli kistik fibrozis olgularında pankreatit riskini düşürdüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (185, 186). Sonraki süreçte diğer varyantlar için de hedefe yönelik moleküller üretilmeye başlanmış ve VX-659–Tezacaftor–Ivacaftor üçlü kombinasyon tedavisi *CFTR* geninin en sık patojenik varyantı olan p.P508del'i taşıyan olgularda yüz güldürücü sonuçlar vermiştir (187, 188).

Hereditör pankreatite bağlı yaşam kalitesi azalan ve gelecek kaygıları bulunan, okul ve iş hayatıyla problemleri olan vakalar sosyal hizmetler desteğine, kariyer danışmanlığına ve psikososyal yardıma ihtiyaç duyarlar (189). Ayrıca olguların kronik ağrıya bağlı artmış opioid ve ek ilaç kötüye kullanımları riski göz önünde bulundurulmalı ve tedavi multidisipliner yönetilmelidir (189).

2.4.4. Kalıtsal Pankreatitlerde Genetik Danışmanlık

Genetik danışmanlık hastaları kalıtım kalıpları, çevresel faktörler, genetik test süreci, önlem alma, ulaşılabilecek kaynaklar ve araştırmalar hakkında bilgilendirmek ile olası risklere karşı önlem alınmasını sağlamayı amaçlar (190). Pankreatit ilişkili genetik varyantlar direkt patojenik etkili, hastalığa yatkınlık sağlayıcı veya hastalığı modifiye edici olabilir ve otozomal dominant, otozomal resesif ya da multigenik kalıtılabilir (11). Otozomal dominant olarak kalıtılan hereditör pankreatitte genellikle *PRSSI* genindeki patojenik değişimler saptanır (190). *PRSSI* varyantlarına bağlı oluşan hereditör pankreatit eksik penetrans göstermekte olup, p.R122H veya p.N29I varyantlarını taşıyan ailelerde penetrans yaklaşık %80 iken, p.A16V ve p.R122C varyantlarında bu oran yaklaşık %40-50'dir (44, 191, 192). *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* varyantlarının heterozigot değişimleri de pankreatit gelişimi riskini anlamlı oranda artırsa da, bu genler için multipl paternde kalıttan bahsedilebilir ve varyantların patojenik etkisini bilinmeyen ek faktörlerle gösterdikleri düşünülmektedir (11, 190).

Pankreatitin sonraki nesillerde tekrarlama riski ailenin genotipine ve semptomları alevlendirebilecek çevresel faktörlerin varlığına bağlıdır (190). Pankreatit ilişkili genlerin patojenik değişimleri açısından heterozigot taşıyıcı olan ebeveynlerin bu değişimleri çocuklarına aktarma ihtimali %50'dir (193). Çocuklarında

hastalık bulgularının oluşması ise varyantların penetransına, veya diğer varyantlarla/risk faktörleri ile etkileşimine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (11, 193). Patojenik değişimi taşıyan bireylerin ebeveynlerinin periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'da patojenik değişime rastlanmasa bile, teorik bir parental mozaizm riski sebebiyle kardeşlerinde yaklaşık %1 ihtimalle aynı varyantın tespit edilebileceği düşünülür (193, 194). *CFTR* geni varyantları pankreatit dışında kistik fibrozis, kronik bronşit, kronik sinüzit ve konjenital vaz deferens agenezisi gibi fenotiplerle de ilişkili olduğundan ailelerin bu hastalıklar açısından da genetik danışma alması gerekmektedir (190). Heterozigot *CFTR* varyantı taşıyan olgular tespit edilmemiş ikinci bir varyant bulunması ihtimaline karşın diğer kistik fibrozis fenotipik bulguları açısından da değerlendirilmelidir (11).

2.5. Genetik Varyasyonları Saptamak İçin Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Yeni Nesil Sekanslama

DNA dizi analizleri 1970'lerde bulunan Maxam-Gilbert ve Sanger metotlarından Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing; NGS) olarak adlandırılan bir grup analiz yöntemine evrilmiştir (195-198). NGS teknolojilerinin eski yöntemlere üstünlüğü aynı anda tek bir fragman yerine milyonlarca kısa fragmanın birbirine paralel olarak dizilenebilmesidir (195). NGS'nin bazı yönleri oldukça kompleks olmasına rağmen, yüksek çözünürlüklü ve az maliyetli olması klinik kullanıma hızla adapte olmasını sağlamıştır (195). NGS'nin uygulandığı alanlar kalıtsal hastalıklar, solid tümörler, hematolojik maligniteler, enfeksiyöz hastalıklar, insan lökosit antijen analizi ve noninvazif prenatal tarama testlerini içerir (195). NGS analizi; laboratuvar aşaması ve sekans verilerinin biyoinformatik analizinin birleştiği aşamalardan oluşur (195).

Laboratuvar süreci; hasta örneklerinin hazırlanması; nükleik asitlerin izole edilmesi, fragmentasyon, barkodlama, gen panelleri veya ekzom hedeflerinin zenginleştirilmesi, adaptor ligasyonu, amplifikasyon, kütüphane hazırlanması, akış hücresi yüklenmesi ve en son olarak sekans okumalarının üretilmesi aşamalarını içerir (195). Sekans üretimi neredeyse her zaman otomatizedir ve ürünler milyonlarca kısa

sekans okumalarını içerir (195). Laboratuvar aşamalarını takip eden bilgisayar ve biyoinformatik analizleri bu kısa okumaları referans insan genomu ile eşleştiren algoritmalarından oluşur (195). Referans sekansla kıyaslama sonrası varyantlar tanımlanır (195). Saptanan varyantların bir kısmının hastalıklarla ilişkisi bilinirken bir kısmının da hastalıklara neden olmadığı bilinmektedir (199). Bu durum varyantların klinik önemini belirtmek amacıyla bir terminoloji ihtiyacını doğurmakta, ve laboratuvarlar genelde Amerika Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (*American College of Medical Genetics and Genomics*; ACMG)'nun 2015 yılında yayınladığı varyant sınıflandırma kılavuzu çerçevesinde saptanan değişimleri patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz, olası benign ve benign olmak üzere 5 farklı sınıfta bildirmektedir (199). Kılavuz önerileri çerçevesinde sınıflandırma; toplum veritabanları, *in silico* analiz programları, fonksiyonel analizler, segregasyon analizleri ve hastalık veritabanlarından elde edilen kriterlere göre yapılır (199). Varyantların özellikleri benignliği tek başına gösteren (*stand-alone*, BA1), benignlik yönünde güçlü (*strong*, BS1-4), benignliği destekleyen (*supporting*, BP1-7) veya patojeniteyi destekleyen (*supporting*, PP1-5), patojenite yönünde orta (*moderate*, PM1-6), güçlü (*strong*, PS1-4) ve çok güçlü (*very strong*, PVS1) kriterler olarak belirlenir (Tablo 2.3.) (199). Bu kriterlerin bir arada bulunma durumlarına göre de uygun olan varyant sınıflandırması seçilerek analiz tamamlanır (Tablo 2.4.).

NGS klinikte özellikle tek nükleotit değişimleri (single nucleotide variants, SNVs) veya insersiyon ve/veya delesyonlara (*insertion and/or deletion*; indels) bağlı oluşan ve fenotipe yol açabilecek her genin tek tek incelenmesinin uygun olmadığı hastalıklarda kullanılır (200). NGS'nin SNV ve indelleri tespit etme sensitivitesi oldukça yüksektir (200). NGS datası kopya sayısı değişimlerinin (*copy number variation*; CNV) tespit edilmesinde de kullanılabilmeyle birlikte, bu analizlerin geçerliliği düşüktür ve bazı hastalıkların ana sebebi olan ekzon delesyonları ile duplikasyonları gibi küçük CNV'leri saptamada yetersizdir (200).

Tablo 2.3. ACMG'nin 2015 kılavuzuna göre NGS varyantlarının değerlendirilme kriterlerinin özeti

	Benign		Patojenik			
	Güçlü	Destekleyici	Destekleyici	Orta	Güçlü	Çok Güçlü
Toplum verileri	MAF'ın hastalık için çok yüksek olması BA1/BS1 Kontrollerde penetranla uyumsuz oranda gözlenmesi BS2			Toplum veritabanlarında varyantın bulunmaması PM2	Etkilenmiş olgulardaki prevelansın kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olması PS4	
Bilgisayar programı ve öngörü verileri		Multipl bilgisayar programının gen/gen ürünü fonksiyonunda değişme öngörmemesi BP4 Sadece <i>truncating</i> varyantların patojenik olduğu gendeki missense değişim BP1 <i>Splicingi</i> etkilemediği öngörülen sessiz varyant BP7 Fonksiyonu bilinmeyen <i>inframe</i> tekrar dizilerdeki indeller BP3	Multipl bilgisayar programının gen/ürünü fonksiyonunda değişme öngörmemesi PP3	Daha önce patojenik missense değişim bildirilmiş bir aminoasit rezidüsünde saptanan missense varyant PM5 Protein uzunluğunu değiştiren varyant PM4	Bilinen patojenik değişimle aynı aminoasit değişimine yol açan varyant PS1	Fonksiyon kaybı mekanizmasıyla oluştuğu bilinen hastalıklarda <i>null</i> varyant oluşumuna yol açtığı öngörülen varyantlar PVS1
Fonksiyonel veri	Seçkin fonksiyonel çalışmalarda patojenik etki görülmemesi BS3		Missense benign varyantların az olduğu bir gende saptanan missense varyant PP2	Hotspot bölgede veya benign varyantların bildirilmediği domaine bulunması PM1	Kaliteli fonksiyonel çalışmalarda patojenik etki görülmesi PS3	
Segregasyon verisi	Varyantın hastalıkla segregasyon olmaması BS4		Varyantın ailede hastalıkla segregasyon olması PP1	Destekleyici segregasyon verisinin artışı		
De novo verisi				<i>De novo</i> varyant (Ebeveynler doğrulanmamış) PM6	<i>De novo</i> varyant (Ebeveynler doğrulanmış) PS2	
Allelik veriler		Dominant varyantla trans pozisyonda saptanması BP2 Patojenik bir varyantla cis pozisyonda saptanması BP2		Resesif hastalıklarda patojenik varyantla trans pozisyonda olması PM3		
Diğer veritabanları		Saygın kaynaklarda veri paylaşılmeden benign olarak bildirilmesi BP6	Saygın bir kaynağın varyantı patojenik bildirmesi PP5			
Diğer veriler		Alternatif bir varyantla beraber bulunması BP5	Hastanın fenotipinin hastalığa oldukça spesifik olması PP4			

Tablo 2.4. ACMG kılavuzuna göre kriterlerin varyant sınıflandırmada kullanımı

Patojenik	PVS 'ye eşlik eden	≥ 1 adet PS kriter veya;
		≥ 2 adet PM kriter veya;
		1 adet PM ve 1 adet PP kriter veya;
		≥ 2 adet PP kriter
	≥ 2 PS kriter	
	1 PS kritere eşlik eden	≥ 3 adet PM kriter veya;
≥ 2 adet PM ve ≥ 2 adet PP kriter veya;		
1 adet PM ve ≥ 4 adet PP kriter		
Olası Patojenik	PVS ve 1 adet PM kriter veya;	
	1 adet PS ve 1 ya da 2 adet PM kriter veya;	
	1 adet PS ve ≥ 2 adet PP kriter veya;	
	≥ 3 adet PM kriter veya;	
	2 adet PM kriter ve ≥ 2 adet PP kriter veya;	
	1 adet PM kriter ve ≥ 4 adet PP kriter	
VUS	Diğer sınıflandırmalara sokulamayan varyantlar	
Olası Benign	1 BS kriter ve 1 BP kriter veya;	
	≥ 2 adet BP kriter	
Benign	BA veya;	
	≥ 2 adet BS kriter	

2.5.2. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

Multipl ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) hastalıklarla ilişkili genetik kopya sayısı değişimlerinin saptandığı bir tekniktir. Bu yöntem ile kromozomal kopya sayısı değişimlerinden tek bir ekzon kopya sayısı değişimine kadar farklı bir skaladaki CNV'ler saptanabilir. MLPA, CNV'lerin tespitinde en sensitif yöntem kabul edilir ve çoğu profesyonel laboratuvar küçük delesyon ve duplikasyonların tespitinde MLPA'dan faydalanır (201). Yöntem distrofinopatiler ve spinal muskuler atrofi gibi sıklıkla CNV'lere bağlı gelişen hastalıklarda ilk tanı testiyken, CNV'lerin daha az ama önemli bir grup hastada tespit edildiği *BRCA* ilişkili ailevi kanser sendromları gibi hastalıklarda da sekans analizlerine ek tamamlayıcı test olarak kullanılır (201).

Yöntem olarak MLPA tek bir primer çifti ile 60'a kadar prob amplifiye edebilen basit bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase chain reaction*; PCR) analizidir. Teknik, DNA denatürasyonu ve MLPA problemlerinin hibridizasyonu, oligo problemlerin ligasyonu, PCR ile prob amplifikasyonu, kapiller elektroforezle amplifiye edilmiş fragmentlerin ayrımı ve verilerin analizi aşamalarından oluşur. (201). MLPA tekniğinde hedeflenen diziler değil, hedef diziyeye hibridize olan MLPA problemleri çoğaltılır. Sonuçta oluşan floresan işaretli fragment uzunlukları kapiller elektroforezle analiz edilebilir. Tespit edilen pik paternler referanslarla kıyaslanarak hedef genomik dizinin kopya sayısı ve anomali durumu tespit edilir (201).

2.6. Pankreatitte Genetik Tanı

İdiyopatik pankreatit olgularının önemli bir kısmında patojenik genetik varyantlar tespit edilmektedir. İdiyopatik rekürren akut pankreatit ve idiyopatik kronik pankreatit olgularında bugüne kadar yapılan genetik analizlerde sırasıyla %30-60 ve %12-43 oranlarında patojenik genetik değişimler bildirilmiştir (52). Pediatrik vakalarda ise akut pankreatitte %10'dan az, rekürren akut pankreatitte yaklaşık %50, kronik pankreatitte ise yaklaşık %75 vakada genetik etiyoloji tespit edilebilmektedir (202). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise idiyopatik pankreatit ana başlığı altında akut pankreatit, rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit tanılarıyla 134

olguda *PRSSI*, *CFTR*, *SPINK1* ve *CTRC* genlerinin yalnızca dizi analizi değerlendirilmiş ve tanı gruplarına göre olguların sırasıyla %63, %58 ve %27'sinde patojenik değişimler saptanmıştır (52).

Genetik varyantların dağılımı dünya genelinde farklılıklar gösterir (203). Planladığımız çalışmaya benzer bir Fransa merkezli çalışmada sadece idiyopatik kronik pankreatit olguları ele alınıp *PRSSI* ile *SPINK1* genleri yüksek performanslı likit kromatografi ile, *CFTR* geni yüksek performanslı likit kromatografi veya DNA *melting* analizi ile, *CTRC* geni ise direk sekanslamayla incelenmiş, ayrıca bu dört genin kopya sayısı değişimleri için kantitatif floresan multipleks PCR yöntemi kullanılmıştır (144). Çalışmada 253 idiyopatik kronik pankreatitli olgunun 122 (%48,2)'sinde patojenik değişimler saptanmıştır (144). Ayrıca patojenik değişim saptanan olguların 22 (%18) 'sinde birden fazla gende varyasyonlar olduğu belirlenmiştir. Asya popülasyonlarında en sık *SPINK1* varyantları saptanırken (~%30-50), *PRSSI* ve *CFTR* varyantları daha nadir gözlenmektedir (203-206). Han Çin'i popülasyonu üzerinde kronik pankreatitli 1061 olgu üzerinde yapılan geniş çaplı bir çalışmada da *PRSSI*, *CFTR*, *SPINK1* ve *CTRC* genleri yalnızca dizi analizi ile değerlendirilmiş olup, olguların %50,42'sinde genetik varyasyonlar bildirilmiştir (122). Araştırmacılar etiyojijiye göre değerlendirdiklerinde idiyopatik kronik pankreatit olgularında bu oranın %57,1, alkole bağlı kronik pankreatitte %39,8 ve sigaraya bağlı kronik pankreatitte %32,1 olduğunu bildirmişlerdir (122). Tüm gruplarda tek başına en sık olarak *SPINK1*, ardından da *PRSSI* varyantları görülmüştür (122). Alman ve Leh çalışmalarında kronik pankreatit olgularında gen varyantları daha eşit olarak dağılmışken, İtalya'da rekürren akut pankreatit olguları için *CFTR* varyantları daha sık rapor edilip (%39,6), *PRSSI* ve *SPINK1* değişimleri daha nadir olarak bildirilmiştir (145, 203, 207, 208). Amerika Birleşik Devletleri'nin farklı bölgelerinde de farklı sıklıkla genetik varyantların saptanması, ırksal ve etnik kökenlere bağlı olarak toplumlarda farklı genetik yatkınlık sebeplerinin oluştuğunu düşündürmektedir (203, 209-211).

Pankreatitin genetik altyapısına yönelik erken dönem çalışmalar daha çok sekans varyantlarına odaklanmışsa da; sonraki süreçte *PRSSI* ve *SPINK1* genlerinin CNV'lerinin de pankreatit patogenezinde etkili olduğu saptanmıştır (144, 212-216).

Fonksiyon kazancı mekanizmasıyla hastalığa yol açtığı bilinen *PRSSI* geninin heterozigot ekzon duplikasyonları ve triplikasyonları ile fonksiyon kaybı mekanizmasının patogenezinde etkili olduğu düşünülen *SPINK1*'in intragenik/tüm gen delesyonları pankreatitli olgularda bildirilmiştir (212-217). *PRSSI* genindeki kopya sayısı artışının gen-doza etkisiyle tripsinojen ekspresyonunu artırdığı ve böylece otoaktivasyon ile intrapankreatik tripsin aktivasyonunun gelişme riskini artırarak etki gösterdiği düşünülse de, etki mekanizması fonksiyonel çalışmalarla direk olarak gözlenmemiştir (47). 2008 yılında idiyopatik kronik pankreatitli Fransız hastalarda yapılan geniş çaplı bir çalışmada *CTRC* geninin CNV'lerine rastlanmamışken, daha sonraki yıllarda kronik pankreatit hastalarında *CTRC* lokusunda heterozigot ve homozigot delesyonlar bildirilmiştir (130, 218). *CFTR* genindeki kopya sayısı değişimlerinin Kistik Fibrozis ile ilişkisi bilinirken, pankreatit olgularında bu konuda detaylı bir araştırma yapılmamıştır (11, 219). Tüm *CFTR* varyantlarının %5'inden azının delesyon/duplikasyonlar olduğu düşünülse de, standart analizlerde kopya sayısı değişimlerine genelde bakılmadığından bu oran beklenenin üzerinde olabileceği varsayılmaktadır (138).

Pankreatit olgularında bugüne kadar hem dizi hem de kopya sayısı varyasyonlarının tüm pankreatit alt gruplarında bildirilmesi ve aynı zamanda olguların önemli bir oranında birden fazla geni ilgilendiren patojenik değişimlere rastlanması, Tıbbi Genetik polikliniğinde değerlendirdiğimiz vakaların genetik incelemelerinde pankreatit ilişkili genlerde NGS ve MLPA yöntemlerinin bir arada çalışılmasının gerekliliğini ve bunun klinik izleme katkısını sorgulatmaktadır. Planladığımız çalışmanın hipotezi “pankreatit olgularının genetik analiz algoritmasında NGS ve MLPA analizlerinin yapılması gereklidir” şeklinde kurulmuş olup; çalışma kohortunda pankreatit ilişkili genetik varyasyonların dağılımının belirlenmesi, sık gözlenen polimorfizmlerin pankreatit etiyopatogenezindeki rolünün değerlendirilmesi, saptanacak genetik varyasyonların klinikle ilişkisinin kurulması çalışmamızın hedefini oluşturmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Araştırma Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Hepatoloji Bilim Dalı iş birliğinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma retrospektif ve prospektif olarak planlanmıştır. Araştırmanın retrospektif kısmında Tıbbi Genetik polikliniğine daha önceden idiyopatik pankreatit tanısıyla yönlendirilmiş olgular dahil edilmiştir. Poliklinik kayıtlarından tespit edilen olgularla iletişime geçilerek ve çalışmaya katılmayı kabul edenlerin klinikleri yeniden değerlendirilerek, uygun olguların NGS sonuçları çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırmanın prospektif kısmında ise, retrospektif kısmına dahil edilen olgularda ilave olarak MLPA analizi yapılmış, bunun yanı sıra yeni olgular için de NGS analizlerine ek olarak MLPA incelemesi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından Karar Tarihi: 06.08.2019, Karar Sayısı: 04 olarak onaylanmıştır. Araştırmaya katılacak katılımcı sayısını belirlemek için PASS11 paket programında güç analizi yapılmıştır. Jalaly, N.Y. ve arkadaşlarının 2017 yılında yayımlanan "An Evaluation of Factors Associated With Pathogenic *PRSSI*, *SPINK1*, *CTFR*, and/or *CTRC* Genetic Variants in Patients With Idiopathic Pancreatitis" çalışmasında görülen varyant oranı göz önünde bulundurularak tek oran için güven aralığı yaklaşımı ile yapılan güç analizinde 1. tip hata %5 kabul edilmiş olup hasta grubu adına en az 46 kişinin çalışmaya dahil edilmesi uygun görülmüştür.

Araştırmaya dahil edilme kriterleri aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- Olguların akut, rekürren akut veya kronik pankreatit tanısı alması:
 - i. Akut pankreatit tanısı aşağıdaki kriterlerin ikisinin sağlanması ile konulmuştur:
 - a. Akut pankreatit ile uyumlu abdominal ağrı (akut, inatçı, şiddetli ve sıklıkla sırta vuran epigastrik ağrı),
 - b. Serum amilaz ya da lipaz aktivitelerinin normalin en az 3 katı kadar artması,

- c. Görüntüleme yöntemleriyle (BT, MRI, transabdominal ultrasonografi) karakteristik bulguların saptanması
- ii. Rekürren akut pankreatit tanısı: aralarında en az 3 aylık tam bir rezolüsyon periyodu bulunan 2 veya daha fazla ayrı akut pankreatit atakları olarak tanımlanmıştır.
- iii. Kronik pankreatit tanısı ise; tekrarlayan karın ağrısı ve serum amilaz / lipaz seviyelerinin en az 3 kat artmasına eşlik eden aşağıdaki kriterlerden en az birinin olması olarak belirlenmiştir:
- a. Ana pankreas kanalı veya yan pankreas kanalı dallarının daraldığına/genişlediğine radyolojik kanıt ve/veya BT ya da MRCP'de pankreas parankiminde kalsifikasyonların görülmesi
- b. Endoskopik ultrasonografiyle veya cerrahi olarak alınan biyopsi örneklerinde kronik pankreatit açısından histolojik kanıt tespit edilmesi

Olguların araştırmaya dahil edilmeme kriterleri ise olgularda idiyopatik pankreatit tanımına uymayacak aşağıdaki etiyolojik risk faktörlerinin tespit edilmesi olarak belirlenmiştir:

- Aşırı alkol tüketimi (≥ 40 g/gün veya ≥ 300 g/hafta),
- Biliyer pankreatit,
- Travma,
- Hiperlipidemi,
- Devam eden aşırı sigara tüketimi (> 20 sigara/gün),
- Pankreatik kanalı tıkayan kitle varlığı,
- Pankreatit etiyolojisinde yer alan ilaç kullanımı öyküsü,
- Hiperkalsemi
- Olgunun kliniğinin pankreatitin eşlik ettiği diğer sendromlarla uyumlu olması

Yukarıda belirtilen kriterler doğrultusunda 23 kadın ve 26 erkek olmak üzere toplam 49 idiyopatik pankreatit tanılı olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

İnsanlarda yaygın gözlenen *CFTR* geninin p.V470M varyantı ile *CTRC* geninin c.180C>T varyantının kendi toplumumuzdaki sıklığını belirlemek amacıyla; anlaşmalı merkezimizde pankreatit ve kistik fibrozis ilişkili hastalık şüphesi dışı endikasyonlarla tüm ekzom dizi analizi planlanmış olguların verileri kullanılmıştır. *CFTR* geninin IVS8-5T varyantının hastalarımızdaki frekansının önemini yorumlamak amacıyla da; hem hiperekojen bağırsak endikasyonu ile prenatal *CFTR* tüm gen dizi analizi planlanmış ailelerden, fetuslerinin genetik sonucu kistik fibrozis ile uyumlu bulunmayan ebeveynlerin verileri; hem de pankreatit dışı herhangi bir endikasyonla (kistik fibrozis ilişkili hastalık veya taşıyıcılık şüphesi) *CFTR* geni tüm gen dizi analizi planlanmış olguların verileri kullanılmıştır.

3.2. Olguların Klinik Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılma kriterlerini sağlayan olguların klinik bulguları olgular ve aileleriyle yapılan karşılıklı görüşmelerde alınan öyküler ve olguların geçmiş hastane kayıtları birlikte değerlendirilerek belirlenmiştir. Olguların klinik bulgularını değerlendirmede kriter olarak aile öyküsü, pankreatik divisum varlığı, ilk semptom başlangıç yaşı ile İnsan Fenotip Ontolojisi (*Human Phenotype Ontology*, HPO) veritabanında herediter pankreatitlerle ilişkili verilmiş fenotiplerden kronik abdominal ağrı, endokrin pankreas yetmezliği için bozulmuş açlık glukozu veya diabetes mellitus, ekzokrin pankreas yetmezliği için de steatore varlığı sorgulanmıştır.

Olguların aile öyküsü ailelerle birebir yapılan görüşmelerde en az üç kuşaklı pedigrı analizi yapılarak belirlendi. Pedigrı analizinde üç kuşağın içinde pankreatit tanısı almış yakını bulunan olguların aile öyküsü pozitif kabul edilmiştir.

Pankreatik divisum varlığı abdomen BT, MRI, endoskopik ultrasonografi, MRCP veya ERCP gibi görüntüleme yöntemleri ile araştırılmıştır. Görüntüleme yöntemleri ile pankreatik divisum tanısı kesin olarak konan olgular bu anatomik varyasyon açısından pozitif, pankreatik divisumu bulunmayan olgular da negatif olarak belirlenmiştir. Görüntüleme yöntemleri uygulanmamış veya görüntüleme yöntemleri ile şüpheli veriler elde edilen olgular pankreatik divisum varlığı açısından değerlendirme dışı bırakılmıştır.

İlk semptom yaşı olgularla yapılan görüşmede pankreatitle uyumlu klinik öykünün ilk olarak başladığı yaş veya olguların hastane öykülerinde pankreatit kliniği ile uyumlu bulguların ilk tespit edildiği yaş olarak belirlenmiştir. Hastaların devam eden ağrılarının varlığı da ailelerle birebir yapılan görüşmelerle öğrenilmiştir.

Ekzokrin pankreas yetmezliğini saptamada ise olgularda pankreatit atakları sonrasında başlayan steatorenin varlığı sorgulanmıştır. Steatore varlığı kronik pis kokulu yağlı diare veya fekal yağ ölçümünde günlük 14 g'ın üstünde yağ atımının varlığı ile belirlenmiştir (220, 221).

Endokrin pankreas yetmezliği ise pankreatit atakları sonrası prediabet veya diabetes mellitus tanısı almış olguların varlığı ile belirlenmiştir. Diabetes mellitus tanısı açlık plazma glukozunun 126 mg/dL'nin üzerinde olması, prediabetes tanısı ise açlık plazma glukozunun 100 mg/dL'nin üzerinde olması olarak belirlenmiştir (222). Pankreatit tanısı öncesinde glukoz metabolizması bozulmuş olan olgular endokrin yetmezlik açısından değerlendirme dışı bırakılmıştır.

3.3. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Aletler

- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- PCR tüpleri (0,2 ml)
- Eppendorf Tüpü (0,5 ve 1,5 ml'lik)
- Mikropipet takımı (2-20-100-1000 µl) (Gilson)
- Vorteks (Heidolph)
- Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700)
- Thermal cycler (Applied Biosystems)
- 3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well plate
- 3130 Applied Biosystems Multiwell 96-well septa
- Kapiller Elektforez Cihazı (ABI Prizm 3130)
- Su banyosu

- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu (Arçelik)
- Ion Chef Cihazı (Thermofisher Scientific)
- Ion S5 Cihazı (Thermofisher Scientific)
- MicroAmp 96 well Optical Reaction Plate (Thermofisher Scientific)
- MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermofisher Scientific)
- Ion 530™ Chip Kit (Thermofisher Scientific)

3.3.2. Kullanılan Malzemeler

- DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)
- SALSA MLPA Probemix P242 Pancreatitis
- SALSA MLPA Probemix P091 CFTR
- Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7™) (ABI)
- 10X EDTA'lı Buffer (ABI)
- Gene Scan 500 Lize Size Standart (ABI)
- Hi-Di Formamide (ABI)
- TE Buffer
- Proteinaz K (Qiagen)
- Distile Su
- Etanol (95%)
- Ion Apmliseq Library v2.0 Kit (Thermofisher Scientific)
- Agencourt Ampure XP (Beckmen – Coulter)
- Ion 520™ / 530™ Kit-Chef (Thermofisher Scientific)
- Ion Express™ Barcode Adaptors 1-16 Kit (Thermofisher Scientific)
- Ion Express™ Barcode Adaptors 17-32 Kit (Thermofisher Scientific)
- Ion Express™ Barcode Adaptors 33-48 Kit (Thermofisher Scientific)
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermofisher Scientific)

3.4. Yöntem

3.4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen olguların periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504) kullanılarak manuel olarak gerçekleştirilmiştir. 1,5 ml'lik *ependorf* tüpe 10µl Proteinaz-K, 200 µl periferik kan örneği ile 200 µl izolasyon solüsyonu eklenmiş; hazırlandıktan sonra 15 saniye vortekslenen karışım 56 °C'ye ayarlanmış ısıtıcıda 30 dk boyunca her 10 dk'da bir vortekslenerek şekilde bekletilmiştir. Isıtıcıda bekletilmenin ardından üzerine kit içerisinde bulunan 210 µl *binding buffer* eklenmiş ve 15 sn vortekslenerek kısa bir spin atılmıştır. Sonrasında tüp içerisindeki karışımın tamamı *spin kolon* tüpüne aktarılıp 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı atılarak yeni tüpe *spin kolon* yerleştirilmiş, *spin kolon* üzerinde 650 µl yıkama solüsyonu 1 eklenmesinin ardından yeniden 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Altta kalan sıvı yeniden atılıp *spin kolon* yeni tüpe yerleştirilmiş ve 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Son olarak altta kalan sıvı yeniden atılarak yeni tüpte 250 µl yıkama solüsyonu 2 eklenmesi ile kolon ikinci kez yıkanarak ardından 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Temiz *ependorf* tüpe *spin kolon* yerleştirilmesinin ardından 50 µl *elution buffer* eklenerek tüpün kapağı kapanmış ve oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. 8000 rpm'de 1 dk yeniden santrifüj edilmesinin ardından hastaya ait DNA örneği elde edilmiştir.

3.4.2. Yeni Nesil Sekanslama

Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirilen pankreatit olgularında *PRSSI*, *SPINK1* ve *CTRC* genlerinin yeni nesil sekanslama analizleri rutin hizmet olarak gerçekleştirilmekte olup bu analizler Anabilim Dalı'nın anlaşmalı olduğu dış laboratuvarında rutin hizmet kapsamında gerçekleştirilmektedir. Çalışmamız kapsamında retrospektif olarak çalışmaya dahil edilen olgularda özellikle normal toplum frekansının çok yüksek olması veya benign/olası benign olarak düşünüldüğü için değerlendirilmeye alınmamış varyantları yeniden incelemek amacıyla bu merkezlerle iletişime geçilerek olguların varyant listeleri, bam - bai dosyaları istenmiş

ve bütün varyantların ACMG kriterleri ile sınıflandırılması yapılmıştır. Prospektif olarak çalışmaya dahil edilen olguların da ilgili genlerdeki dizileme analizleri, yine rutin hizmet bünyesinde dış merkezde gerçekleştirilmiş, ancak dizileme verileri tarafımızca değerlendirilmiştir.

Tüm olgularda *CFTR* geninin yeni nesil sekanslaması Anabilim Dalı'nın Moleküler Genetik seksiyonu laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil dizileme yönteminde *CFTR* geninin dizilenmesi ve biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Çalışma 'Ion Torrent' platformunda gerçekleştirilmiştir.

- Kütüphane Oluşturulması:

Belirtilen genleri içeren "CFTR Primeri" 102 amplikon içermekte olup, Thermofisher Scientific tarafından 2 pool olarak optimize edilmiştir. PCR için gerekli olan kimyasal maddeler (2 µl 5X IonAmpliseqHiFiMix, 5 µl 2X IonAmpliseqPrimerPool, 1 µl gDNA ve 3 µl distile su) Ion Ampliseq Library v2.0 Kit ile sağlanmıştır. 99 °C'de 2 dk, 99 °C'de 15 sn, 60 °C'de 4 dk olmak üzere 19 siklus, +4 °C'de bekleme olacak şekilde PCR yapılmasının ardından PCR ürünleri primerlerin belirli bölgelerinden kesilmek üzere "Enzim Kesim" aşamasına geçilmiştir. PCR ürünlerine 2 µl FuPA enzimi eklenerek 50 °C 10 dk, 55 °C 10 dk, 60 °C 20 dk, +4 °C'de bekleme olacak şekilde PCR şartları uygulanmıştır.

Her bir DNA örneğinin birbirinden ayrılması için farklı oligonükleotid dizisine sahip barkodların kesimi yapılmış PCR örneklerine bağlanması için ligasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada Ion Library v2.0 Kit içerisindeki kimyasallar ve Ion Express Barcode Adaptors 1-16, 17-32, 33-48 ve 49-64 kitleri kullanmıştır. Her bir örnek için farklı barkod kullanılmıştır. PCR ürünleri üzerine 4µl Switch Solution, 2 µl dilue edilmiş BarcodeAdapter Mix (1-64) ve 2 µl DNA Ligase eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 22°C 30 dk, 72°C 10 dk ve 10°C'de bekleme olacak şekilde PCR cihazına konmuştur. Bu aşamadan sonra örnekler uzun süreli olarak -20°C de saklanmıştır.

Elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırılması için Ampure XP manyetik boncukları ile çöktürme yöntemi kitin protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen her bir örneğe ait kütüphane ürünlerinin Qubit®

dsDNA HS Assay Kit ile ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin 15-25 ng/ml olacak şekilde dilasyonları yapılmış ve her örnekten eşit hacimde (10µl) alınarak tek bir tüp içerisinde toplanmıştır. Tek bir tüpte toplanan örneklerden 25 µl alınarak Ion Chef cihazına yüklenmiştir.

- Template Oluşturma, Zenginleştirme, Çipe Yükleme:

Bu aşama Ion Chef cihazı tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Ion 520™ / 530™ kitleri, kartuşlar ve çipler cihaza yerleştirilmiştir. Ion Torrent Suit Software ile plan hazırlanmıştır. Planda hasta isimleri, barkod numaraları, kit bilgileri, çip tipi ve uygun referans dizisi tanımlanmıştır. Reaksiyon sonunda sekanslamaya hazır şekilde çipler cihazdan alınmıştır.

- Dizileme Reaksiyonu:

Dizileme reaksiyonu aşaması Ion S5 cihazında yapılmıştır. Çip yüklemeyen önce yıkama solüsyonları ve dNTP kartuş ile cihazın pH seviyesi düzenlenmiş ve gerekli ölçümler yapıp cihaz hazır konuma geldiğinde çip yüklemesi yapılmıştır. Ion S5 sisteminin çalışma prensibinde her bir dNTP sırayla çipe gönderilir. Uygun baz geldiğinde zincirin uzaması esnasında ortaya çıkan H⁺ atomu ile pH değişikliği meydana gelir. Yıkama işleminden sonra çipe tekrar dNTP gönderilir. Her dNTP gönderimi sonrası yıkama yapılarak zincirin bu şekilde uzaması sağlanır.

- Dizileme Sonuçlarının Analizi:

Biyoinformatik analiz kapsamında yeni nesil dizileme platformundan elde edilen 240 bp ‘single-end dizi’ ham verileri (*.fastq veya UBAM) kullanılmıştır. DNA dizi verilerininin 5’ ve 3’ uçları, daha önce sistemde belirlenen kalite parametleri göz önüne alınarak belli uzunluklarda (primer, A adaptör, P1 adaptör ve Barkod adaptör ile) kesilmiş (sequence trimming) ve elde edilen dizi okuma sonuçları, Torrent Suite v5.4.2 yazılımı aracılığıyla referans insan genom (hg19/GRCh37.p13) dizisine göre hizalanmıştır. Hizalama işlemi sonrasında varyantların belirlenmesi, TorrentVariantCaller (TVC) ile gerçekleştirilmiştir. Sekans duplikasyonların uzaklaştırılmasından sonra, hedeflenmiş ekzon bölgelerinin okuma derinliği “Coverage Analysis plug-in” yaması kullanılarak hesaplanmış, indellerin civarındaki,

lokal hizalamalar, yeniden eşleştirme işlemi “The Genome Analysis Toolkit 3.6-0 (GATK) IndelRealigner” kullanılarak yapılmıştır. Tek nükleotid değişimleri ve küçük indellerin lokasyon belirlenmesi, amino asit değişimleri, fenotip etkenleri gibi mutasyon tarama için eşleştirilmiş dizi okumaları, IonReporter ve IGV programları kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla DNA dizilerinin kalite skor değerleri rekabre edilmiş, düzenlenmiş dizilerdeki varyasyonlar için parametre optimizasyonları yapılmıştır. Elde edilen varyasyon listesi için anotasyon işlemi tamamlanmış ve “Tespit edilen varyasyon yüzdesine göre güvenilir olmayan (<30%) varyasyonlar” ve “Tespit edilen varyasyonların okunma derinliğine göre güvenilir olmayan (<20x) varyasyonlar” elenerek analiz edilmiştir. Kalite skoru 50’nin altında olan varyantlar elenmiş, belirlenen varyasyonlar, IonReporter programı kullanarak fonksiyonel olarak annotate edilerek varyantların gen üzerindeki fonksiyonel sonucu incelenmiştir. Korunmuş bölgelerdeki (conserved regions) varyantlar bulunmuş, varyantların bölgesel tekrar (segmental duplications) kısımlarında yer alıp almadığı belirlenmiş ve global minor allele frequency (MAF) değerleri tespit edilmiştir. Anotasyon aşamasından sonra bireylerdeki varyasyonlar filtrelenerek genomun bölgesel tekrar (segmental duplications) kısımlarında yer alan varyantlar elenmiştir, korunmuş bölgelerde (conserved regions) yer alan ve protein üzerindeki etkisi stop gain, stop lost, splicing variant, frameshift, INDEL, non-synonymous veya synonymous olarak annotate edilen varyantlar belirlenmiştir. Ayrıca, retrospektif olarak incelenen olgulardaki *CFTR* geninin p.V470M ve IVS8-5T varyantları olguların ham dataları analiz edilerek çalışmamızda yeniden değerlendirilmiştir.

- Yeni Nesil Sekanslamada saptanan varyantların sınıflandırılması:

Yeni nesil sekanslama sonucunda saptanan varyantlar ACMG kriterleri ile sınıflandırılmış; varyantların ACMG kriterlerine uygunluğunun değerlendirilmesinde Varsome, Franklin ve Marrvel veritabanlarından yararlanılmıştır (223-225). Hastalık veritabanlarından *PRSSI*, *SPINK1* ve *CTRC* için özellikle “Kronik Pankreatitte Risk Faktörleri”, *CFTR* için ise ek olarak “CFTR2” veritabanları ile Mastermind programı yardımıyla bulunan bilimsel yayınlardan yararlanılmıştır (226-228). Varyantların toplum sıklığını belirlemek için gnomAD öncelikli olmak üzere, TOPMed Bravo, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome ve Iranome veritabanlarından yararlanılmıştır

(229-234). *In silico* değerlendirme programlarından Combined annotation dependent depletion (CADD) phred v1.4, Deleterious annotation of genetic variants using neural networks (DANN), MutationTaster v2, Mutation Assessor, Functional analysis through hidden markov models (FATHMM), FATHMM - multiple kernel learning (FATHMM-MKL), FATHMM - eXtended Feature (FATHMM-XF), Likelihood ratio test (LRT), DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), SIFT4G, Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN), MVP, Rare exome variant ensemble learner (REVEL), PrimateAI, Polymorphism Phenotyping v2.2.2 Human Diversity-based algorithm (Polyphen-2 HumDiv v2.2.2), MetaSVM ve MetaLR kullanılmıştır. CADD skoru 20'nin üzerinde olan değişimlerin hastalığa yol açıcı değişiklik olarak öngörüldüğü belirlenmiştir. Evrimsel korunmuşluğun açıklanması amacıyla phyloP 100way Vertebrate'dan yararlanılmıştır. Saptanan varyantların klinik önemlerini belirlemek veya ailelere genetik danışmanlık vermek amacıyla olguların ulaşılabilen aile üyelerinde yine aynı yeni nesil sekanslama yöntemiyle segregasyon analizleri planlanmıştır.

3.4.3. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

Çalışmaya dahil edilen olguların genlere spesifik NGS analizlerinin yanı sıra genetik kopya sayısı değişimlerinin saptanabilmesi için genomik DNA'lar MLPA yöntemi ile de değerlendirilmiştir. MLPA analizleri Anabilim Dalı bünyesinde gerçekleştirilmiş olup SALSA MLPA Probemix P242 Pancreatitis ve SALSA MLPA Probemix P091 CFTR kitleri (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) kullanılmıştır. Her 7 olgunun analizi için 3 referans olacak şekilde DNA örnekleri hazırlanarak çalışma başlanmıştır. DNA yoğunlukları NanoDrop ile ölçüldükten sonra dilüsyon amacıyla elde edilen 260/280 dalga boyundaki DNA, nanogram değeri 10 µl olacak şekilde ayarlanmış; üzerine 15 µl'ye tamamlayacak kadar TE Buffer eklenerek seyreltilmiş DNA örnekleri hazırlanmıştır. *PRSSI*, *SPINK1* ve *CTRC* genlerinin delesyon duplikasyon analizi için gerekli "SALSA MLPA Probemix P242 Pancreatitis" ve *CFTR* geni için "SALSA MLPA Probemix P091 CFTR" problemleri için iki ayrı örnek grubu planlanmış ve her hasta için 0,2 ml'lik iki PCR tüpüne 5'er µl DNA örneği konulmuştur.

Denatürasyon-hibridizasyon aşaması için ilk olarak örnek başına 1,5 µl Salsa Probe Mix ve 1,5 µl Salsa MLPA Buffer olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Seyreltilmiş DNA'lar PCR cihazında öncelikle 98 °C'de 5 dk denatüre edilmiş, PCR 25 °C'ye geldiğinde örnek başına 3'er µl prob karışımı eklenmiştir. PCR cihazı 25 °C'de 5 dk, 95 °C'de 1 dk ve 60 °C'de de 17,5 saat hibridize edilmiştir.

Ligasyon-Dijesyon aşaması için örnek başına 3 µl Ligase-65 Buffer A, 3 µl Ligase-65 Buffer B, 25 µl distile su ve 1 µl Ligase-65 enzim olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Termalcykler 54 °C'ye getirilerek hazırlanan karışımdan her örneğe 32 µl eklenmiştir. Örnek dağıtım sırasında 54'de 5 dk, ardından 54 °C'de yeniden 15 dk, 98 °C'de 5 dk, 20 °C'de ∞ bekleme olacak şekilde PCR cihazı çalıştırılmıştır.

Ligasyonun da tamamlanmasının ardından PCR reaksiyonuna geçilmiştir. Örnek başına 2 µl Salsa PCR primer mix, 7,5 µl distile su, 0,5 µl Salsa polimeraz olacak şekilde karışım hazırlanmış; hazırlanan karışım ligasyon aşamasındaki PCR biter bitmez her örneğe 10 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Dağıtımla beraber 95 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1 dk'de 35 siklus, 72 °C'de 20 dk ve 15 °C'de ∞ bekleme olacak şekilde PCR yapılmıştır.

Hazırlanan örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesinin öncesinde örnek başına 9 µl Formamide ve 0,2 µl Lize Size karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım her bir kuyuya 9,2 µl olacak şekilde dağıtılarak üzerine 1 µl hazırlanmış PCR örneklerinden eklenmiştir. Plate 86 °C'de 3 dk denatüre edilmiş ve denatürasyon biter bitmez plate -20 °C'de 3 dk şoklanmıştır. Şoklanmış örnekler A-3130 Kapiller elektroforez cihazına yüklenmiş ve elektroforez dataları Coffalyser programında analiz edilerek olgularda delesyon veya duplikasyon varlığı araştırılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analizler

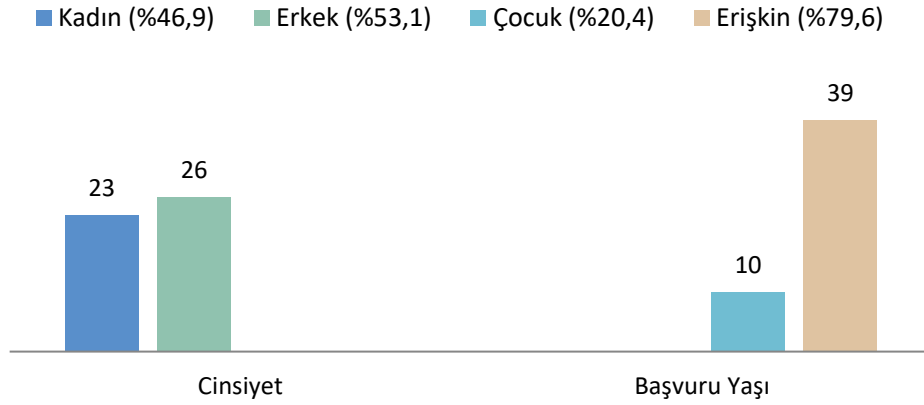
Çalışmanın analizleri IBM SPSS 21 ile yapılmıştır. Kategorik değişkenlere ait özet değerler frekans ve yüzde olarak, nicel değişkenler ise ortalama ± standart sapma ve ortanca değerler kullanılarak gösterilmiştir. Kategorik değişkenler arası ilişki ki-

kare analizleri (Fisher exact, Yates, Pearson) ile incelenmiştir. Analiz sonucu $p < 0,05$ olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmaya araştırmaya katılma kriterlerimizce tanısı idiyopatik pankreatit ile uyumlu olan 49 olgu dahil edildi. Olguların 23 (%46,9)'ü kadınken, 26 (%53,1)'sı erkekti (Şekil 4.1.). Araştırmaya dahil edilen olguların 10 (%20,4)'u çocuk, 39 (%79,6)'u erişkin hastayken, ortalama yaş 30,41 ($\pm 15,97$, ortanca:30) idi (Şekil 4.1.).

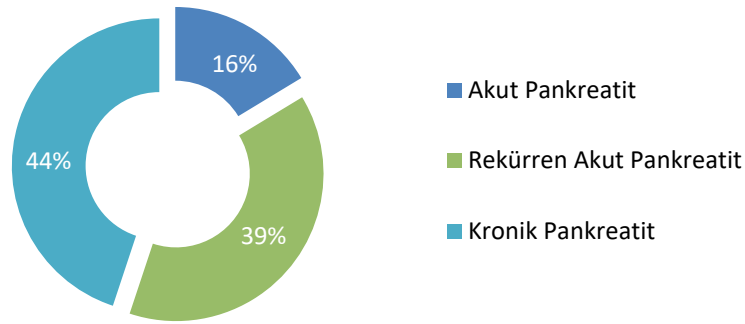


Şekil 4.1. Araştırmaya dahil edilen olguların cinsiyetleri ve başvuru yaşlarının dağılımı

Toplumda yaygın gözlenen varyantların karşılaştırmasında kullandığımız kontroller 2 ayrı gruptan oluşmaktaydı. *CFTR* geninin IVS8-5T allelinin toplum sıklığını araştırmak için fetüslerinde kistik fibrozis saptanmayan hiperekojen bağırsaklı toplamda 47 çift olmak üzere 94 ebeveyn kontrol grubu olarak seçildi. Ebeveynlerin yaş ortalaması 32,79 ($\pm 7,21$, ortanca: 31,5) olarak belirlendi. Yine *CFTR* geninin IVS8-5T allelinin sıklığını karşılaştırmak için kullanılan, ancak kontrol grubu olarak belirlenmeyen pankreatit dışı tüm endikasyonlarla *CFTR* geni dizi analizi çalıştığımız hasta sayısı 669 olarak bulundu. *CTRC* geni c.180C>T ve *CFTR* geni c.1408G>A varyantlarının sıklığını karşılaştırmak için anlaşmalı merkezimizde 2093 olgudan yapılan tüm ekzom dizi analizi verilerinden faydalanıldı.

4.2. Olguların Klinik Özellikleri

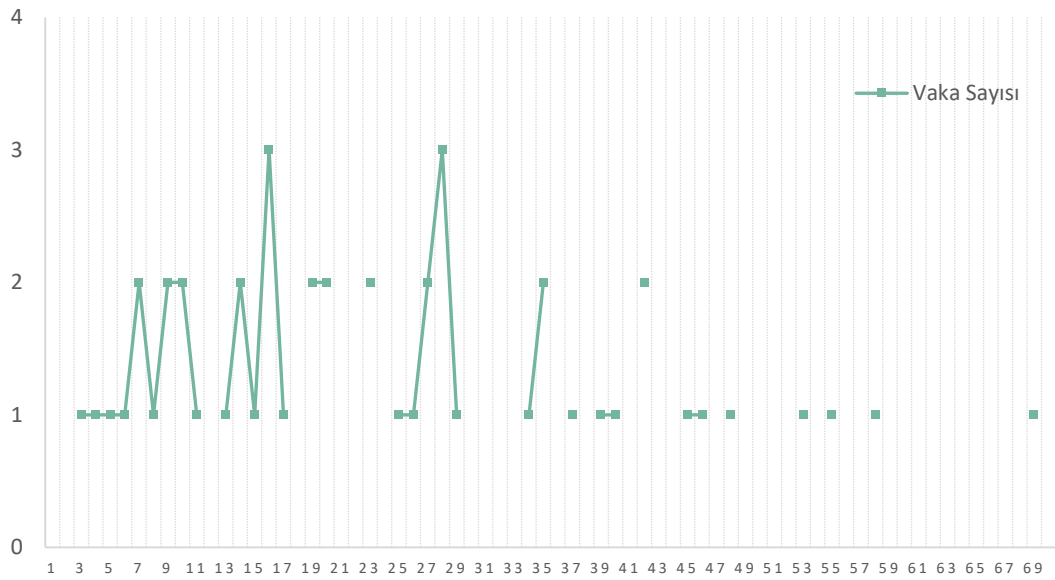
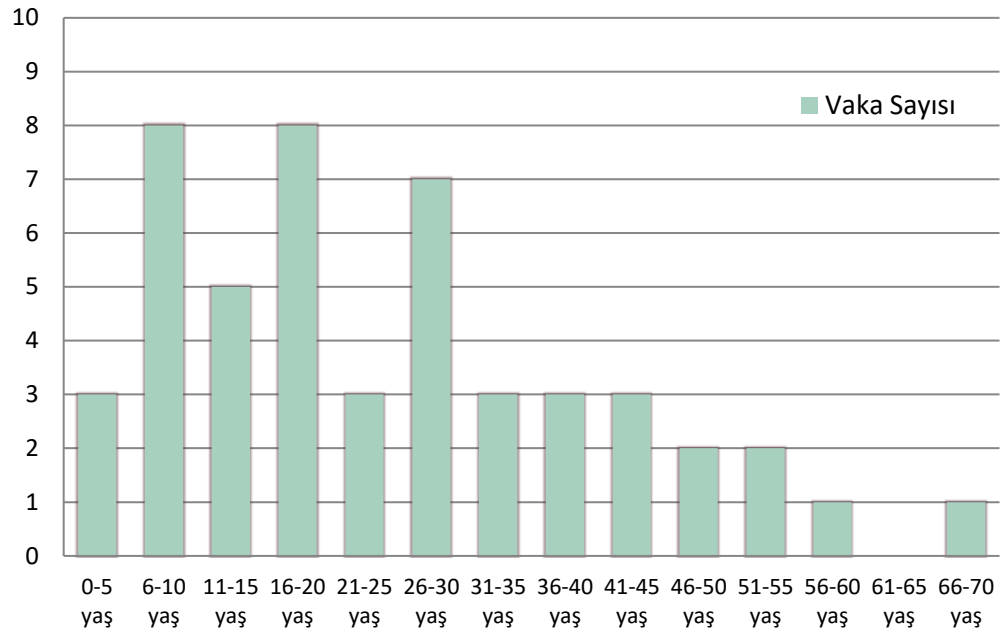
Çalışmaya dahil edilen olguların 8 (%16,3)'i idiyopatik akut pankreatit, 19 (%38,8)'u idiyopatik rekürren akut pankreatit ve 22 (%44,9)'si idiyopatik kronik pankreatit tanı kriterlerini sağlamaktaydı (4.2.).



Şekil 4.2. Araştırmaya dahil edilen vakaların tanı sınıflaması

Değerlendirme esnasında olgularımızın büyük çoğunluğu erişkin yaş grubunda olsa da, semptomların başladığı yaşa göre değerlendirme yapıldığında, hastaların çoğunda semptomların pediatrik dönemde başladığı tespit edildi. Olguların ilk atak başlangıç yaşları totalde 3-69 arası değişmekteyken, özellikle 6-20 ve 25-29 yaş aralığında yoğunlaşmaktaydı (Şekil 4.3.). Vakalarımızdaki ortalama ilk atak başlangıç yaşı ise 25,10 ($\pm 15,98$, ortanca: 23) olarak belirlendi.

Pankreasın konjenital yapısal anomalileri açısından değerlendirilebilen 45 vakanın 8 (%17,8)'inde uygulanabilen görüntüleme yöntemleri kapsamında pankreatik divisum bulunduğu belirlendi (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). Diğer 4 vakada görüntüleme yöntemlerinin uygulanamaması veya görüntüleme yöntemlerinde şüpheli sonuçlar elde edilmesi sebebiyle pankreatik divisum değerlendirmesi yapılmadı.

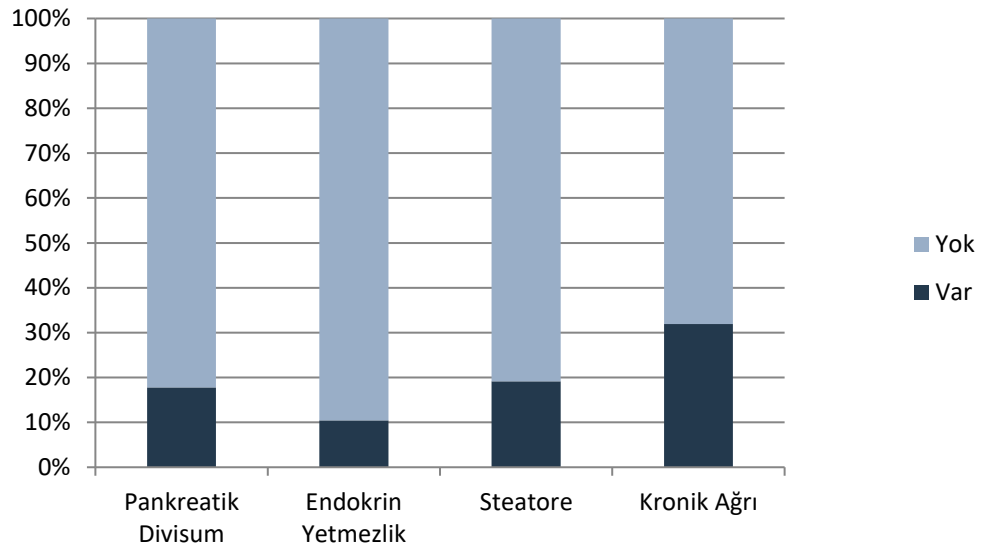


Şekil 4.3. İlk atak başlangıç yaşlarına göre olgu sayısının dağılımı



Şekil 4.4. 14 nolu olguda MRCP ile saptanan pankreatik divisumun görüntüsü

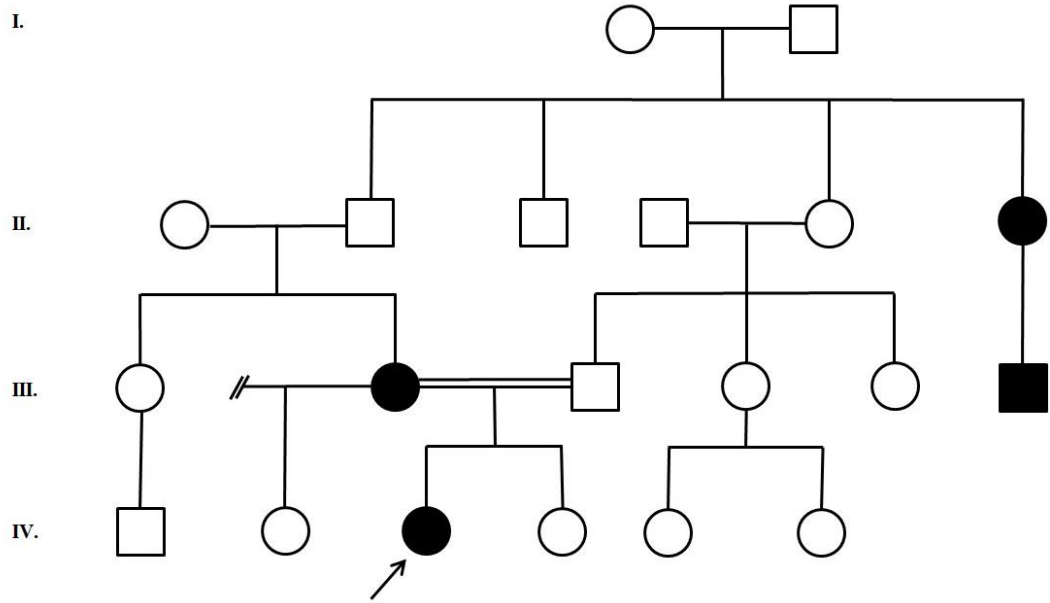
Endokrin ve ekzokrin yetmezliği düşündürülen bulgular açısından değerlendirilebilen olgulardan 5/48 (%10,4)'inde endokrin yetmezlik açısından anlamlı bozulmuş açlık glukozu veya diabetes mellitus geliştiği; ekzokrin yetmezlik açısından sorgulanan olguların 9/47 (%19,1)'sinde steatore olduğu bilgisi alındı. Steatoreli vakaların 6'sı kronik pankreatit, 3'ü rekürren akut pankreatit vakasıyken; endokrin yetmezlik geliştiği tespit edilen tüm olguların tanısı kronik pankreatit idi. Tüm tanı gruplarında 15/47 (%31,9) olguda devam eden kronik abdominal ağrı olduğu tespit edilirken; kronik pankreatit tanısı alan olguların 11/22 (%50)'sinde; rekürren akut pankreatitli olguların ise 4/18 (%22,2)'sinde kronik abdominal ağrı olduğu öğrenildi. Akut pankreatit grubunda ise değerlendirilebilen olguların hiçbirinde devam eden abdominal ağrı bulunmamaktaydı (0/7, %0) (Şekil 4.5.).



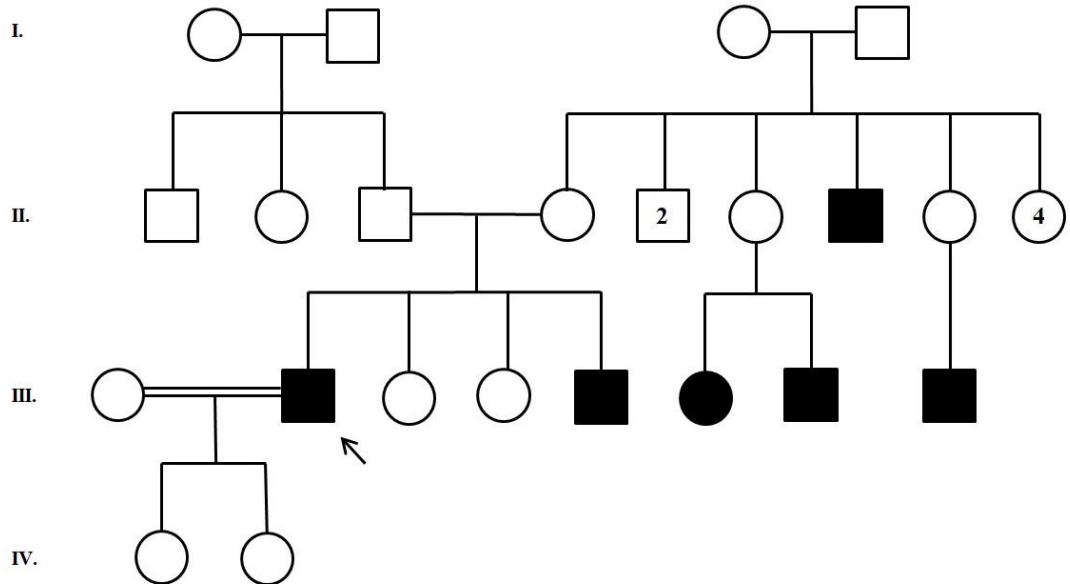
Şekil 4.5. Tüm gruplarda verilen klinik özelliklere sahip olguların yüzdesel dağılımı

4.3. Olguların Aile Öyküleri

Araştırmaya katılan 10/49 (%20,4) olguda daha önce ailelerinde pankreatit tanısı almış bireylerin olduğu öyküsü alındı. Aile öyküleri olan hastaların pedigri analizleri değerlendirildiğinde, 4 nolu olgunun annesinde, annesinin halası ve annesinin halasının oğlunda da pankreatit tanısı olduğu öğrenilmişken; annenin babasında bu fenotipin varlığı bildirilmedi. Vakada eksik penetranslı otozomal dominant kalıtıma sahip bir genetik varyasyon bulunabileceği öngörüldü (Şekil 4.6.). 22 nolu olguda ise aynı çekirdek ailede multipl etkilenmiş birey olmasına rağmen ebeveynlerde fenotipik bulguların olmaması resesif kalıtımı düşündürmüştü de, ailede akrabalık bağının olmaması, daha uzaktan akrabaların fenotipik özellikleri ve pankreatit ilişkili genetik faktörlerin genellikle dominant etkili olması göz önüne alındığında, bu ailede de eksik penetrans gösteren heterozigot bir varyantın bulunabileceği de göz önünde bulundurulmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.6. 4 nolu olgunun pedigrisi analizi gösterilmiştir. İçi dolu kutucuklar hastalığı fenotipinde gösteren aile üyelerini tanımlamaktadır.



Şekil 4.7. 22 nolu olgunun pedigrisi analizi gösterilmiştir. İçi dolu kutucuklar hastalığı fenotipinde gösteren olguları tanımlamaktadır.

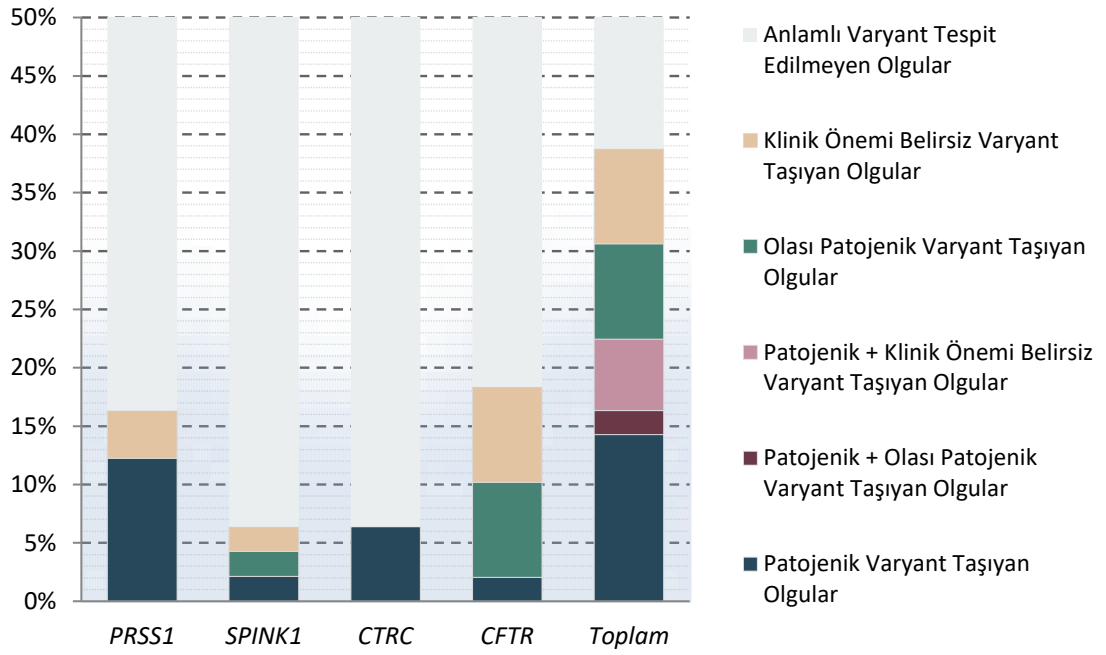
4.4. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

Yapılan genetik incelemeler sonucunda *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genleri için yeni nesil dizi analizi uygulanan sırasıyla 49, 47, 47 ve 49 adet olgunun 8 (%16,3), 3 (%6,4), 3 (%6,4) ve 9 (%18,4)'unda klinik öneme sahip olabilecek değişiklikler tespit edilmiştir. *PRSSI* geninde saptanan anomalilerin 6 (%12,2)'sı patojenik, 2 (%4,1)'si klinik önemi bilinmeyen varyantken; *SPINK1* geninde tespit edilenlerin 1 (%2,1)'i patojenik, 1 (%2,1)'i olası patojenik, 1 (%2,1)'i klinik önemi bilinmeyen varyant; *CTRC* geninde saptananların 3 (%6,4)'ü de patojenik ve *CFTR* geninde tespit edilenlerin 1 (%2)'i patojenik, 4 (%8,2)'ü olası patojenik, kalan 4 (%8,2)'ü de klinik önemi bilinmeyen varyantlardı (Şekil 4.8.). Retrospektif olarak değerlendirilen olguların 2'sinde önceki hastane başvurularında *SPINK1* ve *CTRC* analizleri planlanmadığı için, bu genlerin dizi analizleri sonuçlandırılmamıştır.

Kopya sayısı değişimlerinin saptanması amacıyla yapılan MLPA testinde ise 49 olgunun 47'sinde sonuç alınabilmiş, ancak bunların hiçbirinde *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genlerinin kopya sayısı değişimlerine rastlanmamıştır. MLPA analizi sonuçlanamayan 2 olgunun verileri analiz edilemediğinden değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Bütün genetik incelemelerde sonuç alınabilen olguların 4/45 (%8,9)'inde, toplumda sık görülen varyantlar dışında, birden fazla geni ilgilendiren genetik değişimler saptanmıştır. Bunlardan *CFTR/CTRC* varyantlarının birlikteliği 2 (%4,4), *CFTR/PRSSI* varyantlarının birlikteliği 1 (%2,2), *CFTR/SPINK1* varyantlarının birlikteliği de yine 1 (%2,2) olguda tespit edilmiştir.

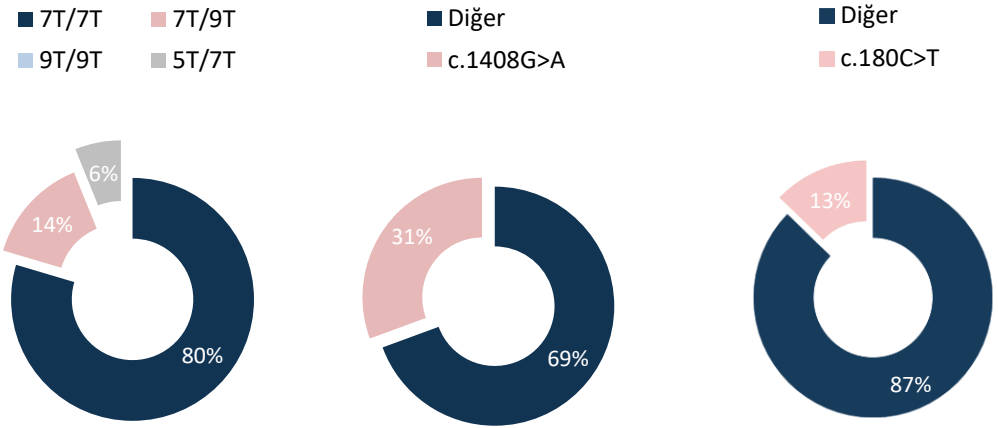
Bütün varyantlar beraber değerlendirildiğinde; olgularımızın 7 (%14,3)'sinde tek başına, 1 (%2)'inde eşlik eden olası patojenik bir varyant ile birlikte, 3 (%6,1)'ünde de eşlik eden klinik önemi belirsiz değişimler ile birlikte olmak üzere toplamda 11 (%22,4) hastada patojenik varyantlar saptandı. Olguların 4 (%8,2)'ünde olası patojenik varyantlar ve yine 4 (%8,2)'ünde de klinik önemi belirsiz varyantlar izole şekilde bulunmak üzere; toplam 19 (%38,8) vakada klinik anlam ifade edebilecek değişimler tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).



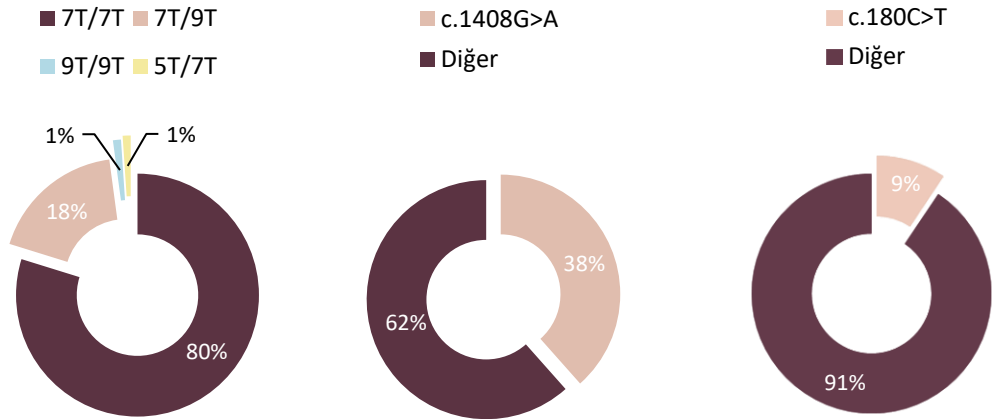
Şekil 4.8. Tespit edilen varyantların ACMG sınıflandırmasına göre oransal dağılımı

Diğer varyantlardan ayrı bir grupta değerlendirilen yaygın varyantlardan *CFTR* geni IVS8-5T ve c.1408G>A (p.V470M) varyantlarının allel frekansları sırasıyla 3/98 (%3,1) ve 30/98 (%30,6); *CTRC* geni c.180C>T varyantının allel frekansı ise 12/94 (%12,8) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9.). *CFTR* geni IVS-5T varyantının frekansı kontrol grubumuzda 1/188 (%0,05) ve pankreatit dışı herhangi bir endikasyonla *CFTR* geni dizi analizine yönlendirilen hastalarda 19/1338 (%1,4) olarak bulundu. *CFTR* geni c.1408G>A (p.V470M) varyantının allel frekansı tüm ekzom sekanslama verilerinde 1609/4186 (%38,4) iken; *CTRC* geni c.180C>T varyantının frekansı 393/4186 (%9,4) olarak bulunmuştur (Şekil 4.10.).

Toplumda yaygın olarak gözlenen ve pankreatit riskiyle ilişkisi araştırılan bu varyantlardan *CFTR* geni c.1408G>A varyantının allel frekansı vaka grubumuzda kontrol grubumuzdan daha düşük oranda saptanmıştır (%30,6 ve %38,4). IVS-5T frekansı vaka grubumuzda kontrol grubumuzdan yaklaşık 6 kat, pankreatit dışı tüm endikasyonlardaki hastalardan 2 kat yüksek olsa da, varyantın pankreatit riskine yol açması açısından istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. (p=0,118). Yine *CTRC* geninin c.180C>T dönüşümünün frekansı vaka grubumuzda daha yüksek tespit edilse de, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,353) (Tablo 4.6.).



Şekil 4.9. Yaygın varyantların pankreatit olgularında allelik dağılımı. a) *CFTR* geni Poli-T varyantlarının allelik dağılımı b) *CFTR* geni p.470VM varyantının allelik dağılımı c) *CTRC* geni c.180C>T varyantının allelik dağılımı



Şekil 4.10. Yaygın varyantların kontrol grubunda allelik dağılımı. a) *CFTR* geni Poli-T varyantlarının allelik dağılımı b) *CFTR* geni c.1408G>A varyantının allelik dağılımı c) *CTRC* geni c.180C>T varyantının allelik dağılımı

Tablo 4.1. Çalışmamızda değerlendirilen olgular ve moleküler genetik incelemelerinin sonuçları

#	<i>PRSSI</i> NGS	<i>SPINK1</i> NGS	<i>CTRC</i> NGS	<i>CFTR</i> NGS	<i>PRSSI</i> MLPA	<i>SPINK1</i> MLPA	<i>CTRC</i> MLPA	<i>CFTR</i> MLPA	<i>CTRC</i> c.180C>T	<i>CFTR</i> p.V470M	<i>CFTR</i> Poli-T
#1	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#2	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 9T
#3	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#4	c.365G>A / n	n / n	n / n	c.1516A>G / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#5	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#6	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#7	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#8	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#9	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#10	c.310C>G / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#11	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 9T
#12	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#13	c.365G>A / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	V / V	7T / 7T
#14	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / V	7T / 7T
#15	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / M	7T / 9T
#16	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#17	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / V	7T / 7T
#18	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T

#	<i>PRSSI</i> NGS	<i>SPINK1</i> NGS	<i>CTRC</i> NGS	<i>CFTR</i> NGS	<i>PRSSI</i> MLPA	<i>SPINK1</i> MLPA	<i>CTRC</i> MLPA	<i>CFTR</i> MLPA	<i>CTRC</i> c.180C>T	<i>CFTR</i> p.V470M	<i>CFTR</i> Poli-T
#19	n / n	n / n	c.703G>A / n	c.2605A>G / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#20	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	V / V	7T / 7T
#21	n / n	n / n	n / n	c.3151A>G / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / V	7T / 7T
#22	n / n	n / n	c.703G>A / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#23	n / n	n / n	n / n	c.274-6T>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#24	c.365G>A / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#25	n / n	n / n	n / n	c.2991G>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 9T
#26	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#27	n / n	n / n	c.703G>A / c.703G>A	c.4220T>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#28	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#29	n / n	c.181T>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#30	c.365G>A / n	S/A	S/A	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	S / A	M / M	7T / 7T
#31	n / n	n / n	n / n	c.869+2T>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#32	c.62A>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#33	n / n	c.162delT / n	n / n	n / n	S/A	S/A	S/A	S/A	T / T	V / V	7T / 7T
#34	c.364C>T / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / M	7T / 7T
#35	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / V	7T / 7T
#36	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	5T / 7T

	<i>PRSSI</i> NGS	<i>SPINKI</i> NGS	<i>CTRC</i> NGS	<i>CFTR</i> NGS	<i>PRSSI</i> MLPA	<i>SPINKI</i> MLPA	<i>CTRC</i> MLPA	<i>CFTR</i> MLPA	<i>CTRC</i> c.180C>T	<i>CFTR</i> p.V470M	<i>CFTR</i> Poli-T
#37	n / n	n / n	n / n	c.2991G>C / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 9T
#38	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	5T / 7T
#39	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#40	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	V / V	7T / 7T
#41	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	M / V	7T / 7T
#42	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / M	7T / 9T
#43	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / M	7T / 7T
#44	n / n	c.194+2T>C / n	n / n	c.358G>A / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 9T
#45	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / T	V / V	7T / 7T
#46	n / n	n / n	n / n	n / n	S/A	S/A	S/A	S/A	C / T	V / V	5T / 7T
#47	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#48	c.592-4C>T / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	C / C	M / V	7T / 7T
#49	n / n	S/A	S/A	n / n	n / n	n / n	n / n	n / n	S/A	M / V	7T / 7T

NGS: Yeni nesil sekanslama,

MLPA: Multipl ligasyon bağımlı amplifikasyon,

T: Timin,

V: Valin,

M: Metiyonin

Olguların her iki alleli kesme işareti ile ayrılarak gösterilmiştir.

n: Yabancı allele,

S/A: Sonuç alınmadı

4.4.1. Yeni Nesil Sekanslama Analiz Sonuçları

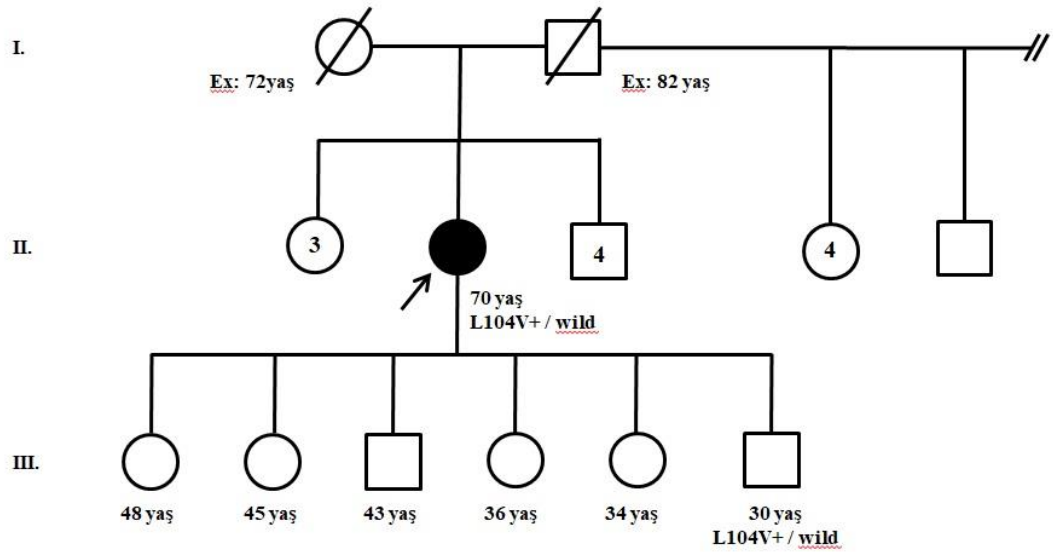
- *PRSSI* geni c.310C>G (p.L104V) varyantı:



Şekil 4.11. 10 nolu olguda saptanan c.310C>G (p.L104V) varyantının görüntüsü

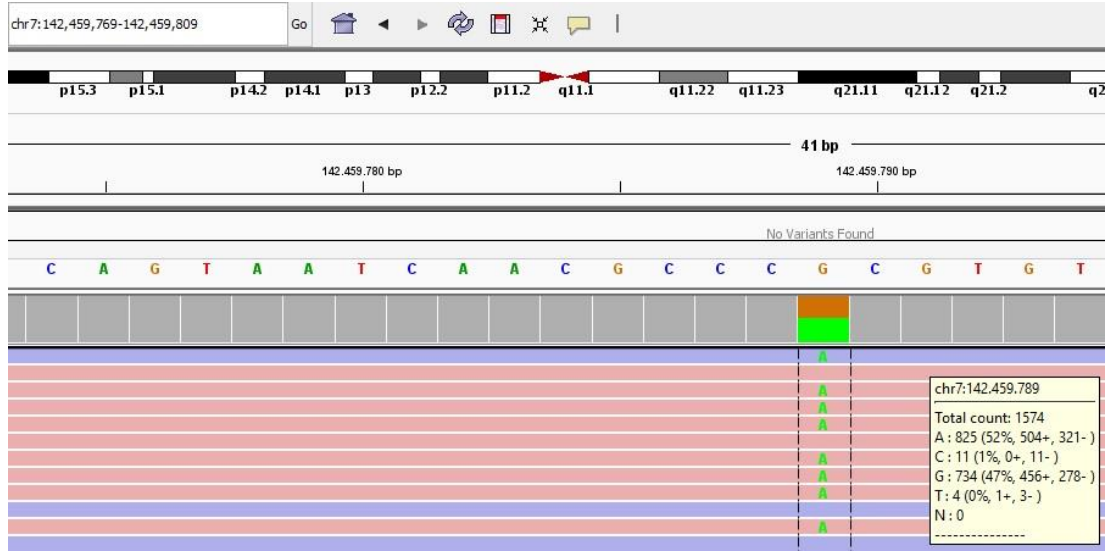
Olgu 10'da heterozigot missense c.310C>G (p.L104V) değişimi saptanmıştır (Şekil 4.11.). 104. pozisyondaki lösin, tripsinin substrat bağlayan bölgesinin korunmuş hidrofobik S2 alt bölümünde yerleşmiştir (235). *In silico* değerlendirme araçlarından CADD, DANN, Mutation Assessor, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PROVEAN, MVP, REVEL, PrimateAI, PolyPhen, MetaSVM, MetaLR varyantın proteinde patojenik bir etkiye yol açmadığını tahmin ederken; MutationTaster ve FATHMM varyantın patojenik olabileceğini öngörmektedir. Saptanan varyant daha önce nadir bir pankreatik neoplasm olan solid psödopapiller tümörlü iki kız kardeş ve bu kardeşlerin sağlıklı iki erkek yakınında bildirilmiştir (236). Kız kardeşlerin görüntüleme bulgularında kronik pankreatit düşündürülen pankreatik kalsifikasyonlar gözlenmesi nedeniyle yazarlar bu varyantın olguların kliniğinde etkili olabileceğini yorumlamıştır (236). Varyant gnomAD ekzom/genom, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome

veritabanlarında bildirilmemiş; kalıtsal pankreatit hastaları varyant veritabanlarında da klinik önemi belirsiz değişiklik olarak sınıflandırılmıştır (47, 226). Proteinin aynı noktasında farklı bir aminoasit değişimine yol açan c.311T>C (p.L104P) değişimi birkaç farklı yayında pankreatitle ilişkilendirilmiş ve fonksiyonel analizlerde özellikle protein yanlış katlanması ve endoplazmik retikulum stresi artışına bağlı patojenik etkide bulunduğu gösterilmiştir (235, 237, 238). Varyantın klinik önemini araştırmak için planlanan aile analizlerinde, şu an için olgunun sadece 30 yaşındaki asemptomatik oğlu incelenmiş ve aynı varyant tespit edilmiştir (Şekil 4.12.). Tüm bu veriler çerçevesinde, ACMG kriterlerinden PM2, PM5 ve BP4'ü sağlayan varyant **klinik önemi belirsiz değişiklik** (*variant of uncertain significance; VUS*) olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 4.12. 10 nolu olgunun pedigrisi analiz gösterilmiştir. İçi dolu kutucuklar hastalığı fenotipinde gösteren olguları tanımlamaktadır.

- *PRSSI* geni c.365G>A (p.R122H) varyantı:



Şekil 4.13. 13 nolu olguda tespit edilen c.365G>A (p.R122H) varyantının görüntüsü

4, 13, 24 ve 30. olgularda heterozigot olarak saptanan bu varyantı (Şekil 4.13.) MutationTaster ve FATHMM dışındaki bütün *in silico* programlar tolere edilebilir olarak değerlendirmiş olsa da; p.R122H varyantı herediter pankreatit olgularında ilk bildirilen ve aynı zamanda en sık (~%65) tespit edilen patojenik değişimdir (6, 47). Popülasyon veritabanlarında da oldukça nadir olarak rastlanan (gnomAD: %0,001062) varyantın; fonksiyonel çalışmalarla tripsinojen otoaktivasyonunu artırdığı ve CTRC bağımlı degradasyona direnç sağladığı gösterilmiştir (45). Patojenik değişimlerin oldukça sık bildirildiği bir bölgede lokalize olan bu varyant ACMG kriterlerinden PS1, PS3, PS4, PM1, PM2, PM5, PP5 ve BP4'ü de sağladığından **patojenik** olarak sınıflandırılmıştır (226).

- *PRSSI* geni c.62A>C (p.D21A) varyantı:



Şekil 4.14. 32 nolu olgudaki c.62A>C (p.D21A) varyantının görüntüsü

32 nolu olguda heterozigot olarak görülen bu missense değişimin frekansı gnomAD ekzom/genom, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome veritabanlarında bildirilmemiştir (Şekil 4.14.). Patojenik değişimlere sık rastlanan bölgede lokalize olan varyantı; *in silico* programlardan CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, DEOGEN2, SIFT, SIFT4G, PolyPhen, PROVEAN, REVEL, PrimateAI, MetaSVM, MetaLR hastalığa yol açıcı olarak yorumlarken; EIGEN, EIGEN PC, MVP ve Mutation Assessor tolere edilebilir değişim olarak öngörmüştür. Varyant literatürde daha önce bir Türk ailenin 3 etkilenmiş üyesi ile 2 ayrı vakada daha bildirilmiştir (239-241). Ayrıca pankreatit veritabanında da varyantın patojenik değişim olduğu belirtilmiştir (47, 226). Fonksiyonel çalışmalar varyantın tripsinojenin otoaktivasyonunu 2 kat artırdığını göstermiştir (242). ACMG kriterlerinden PS3, PM1, PM2, PP3 ve PP5'i sağlayan varyant **patojenik** olarak sınıflandırılmıştır.

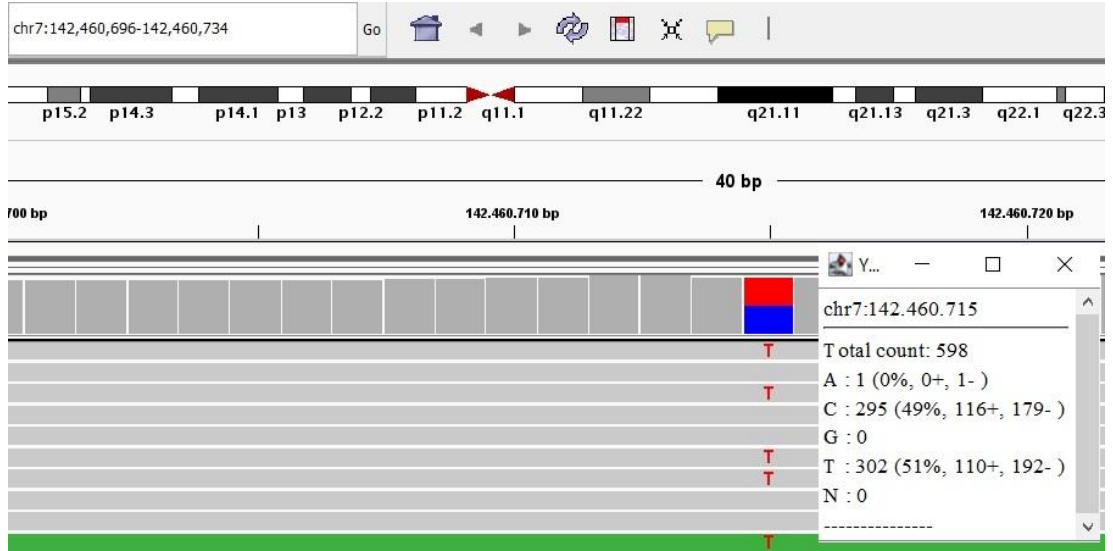
- *PRSSI* geni c.364C>T (p.R122C) varyantı



Şekil 4.15. 34 nolu olguda saptanan c.364C>T (p.R122C) varyantının görüntüsü

34 nolu olguda heterozigot olarak saptadığımız bu missense varyant daha önce pankreatit olgularında oldukça sık olarak tespit edilmiş ve pankreatit veritabanlarında patojenik olarak bildirilmiştir (Şekil 4.15.) (47, 191, 226, 243). Fonksiyonel çalışmalar varyantın tripsinojen otoaktivasyonunu artırdığı ve CTRC bağımlı degradasyona da direnç sağladığını göstermiştir (45). Toplum veritabanlarından gnomAD'de frekansı %0,003193 olarak verilen varyanta TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome veritabanlarında rastlanılmamıştır. Patojenik değişimlerin sık gözlendiği bölgede bulunan ve *in silico* programların çelişkili öngörülerde bulunduğu bu varyant ACMG kriterlerinden PS3, PM1, PM5, PP2 ve PP5'i sağladığından **patojenik** olarak değerlendirilmiştir.

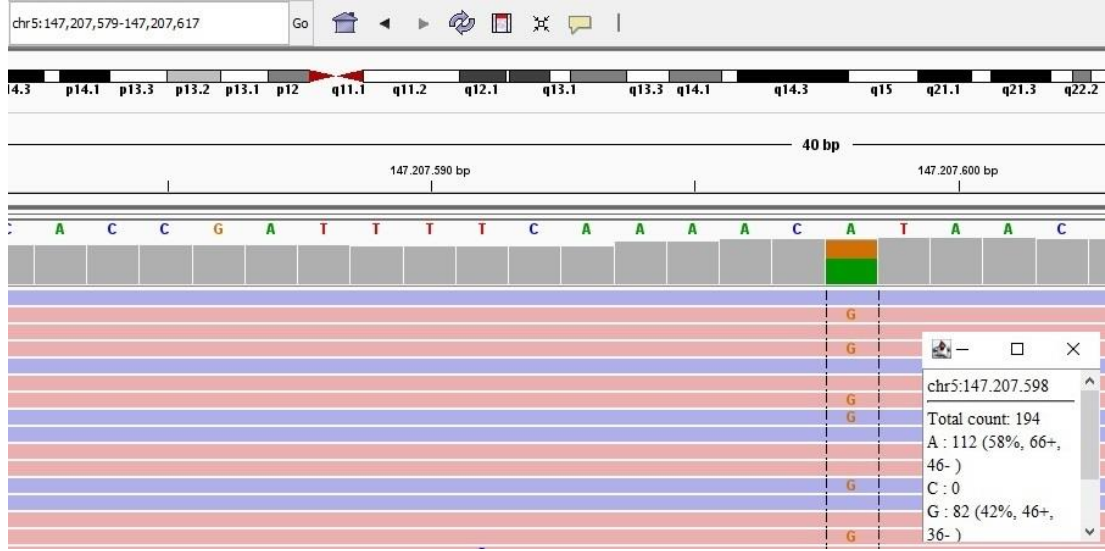
- *PRSSI* geni c.592-4C>T varyantı



Şekil 4.16. 48 nolu olguda saptanan c.592-4C>T varyantının görüntüsü

48 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu varyantın gnomAD veritabanında frekansı %0,003182 olarak verilmiş olup, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome veritabanlarında ve pankreatit veritabanında bildirilmemiştir (Şekil 4.16.) (226). *In silico* analizlerden Splice AI Exome, dbsSNV Ada ve RF varyantı benign olarak değerlendirmiştir. Varyantın değerlendirilmesinde yeterince veriye sahip olunamadığından, ACMG kriterlerince **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

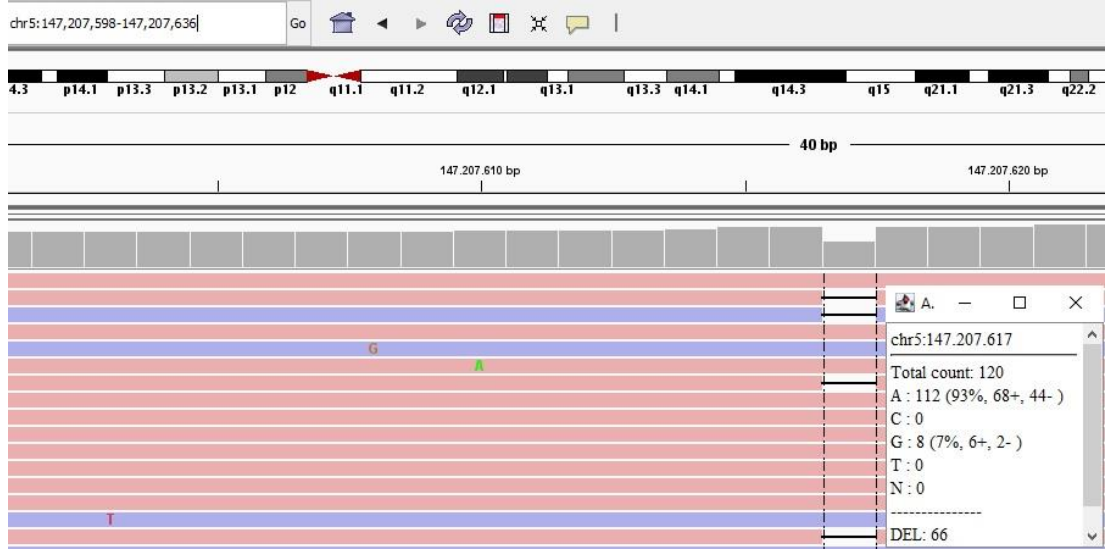
- *SPINK1* geni c.181T>C (p.C61R) varyantı:



Şekil 4.17. 29 nolu olguda saptanan c.181T>C (p.C61R) varyantının görüntüsü

29 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu değişim SPINK1 proteininin disülfid bağı yapan domaninini etkiler (Şekil 4.17.). Varyant gnomAD ekzom/genom, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, Iranianome veritabanlarında bildirilmemiş olmakla birlikte GME Variome veritabanında 1985 allelin 1'inde görülmüş, %0,05 frekansla oldukça nadir bir varyant olarak tanımlanmıştır. *In silico* değerlendirme araçlarından CADD, MutationTaster, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PROVEAN, PolyPhen, MVP, REVEL, MetaSVM, MetaLR varyantın patojenik etkili olacağını öngörürken; DANN, DEOGEN2, EIGEN ve PrimateAI benign etkili olduğunu tahmin etmektedir. ACMG kriterlerinden PM1, PM2 ve PP3'ü sağlayan varyant, **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırmıştır.

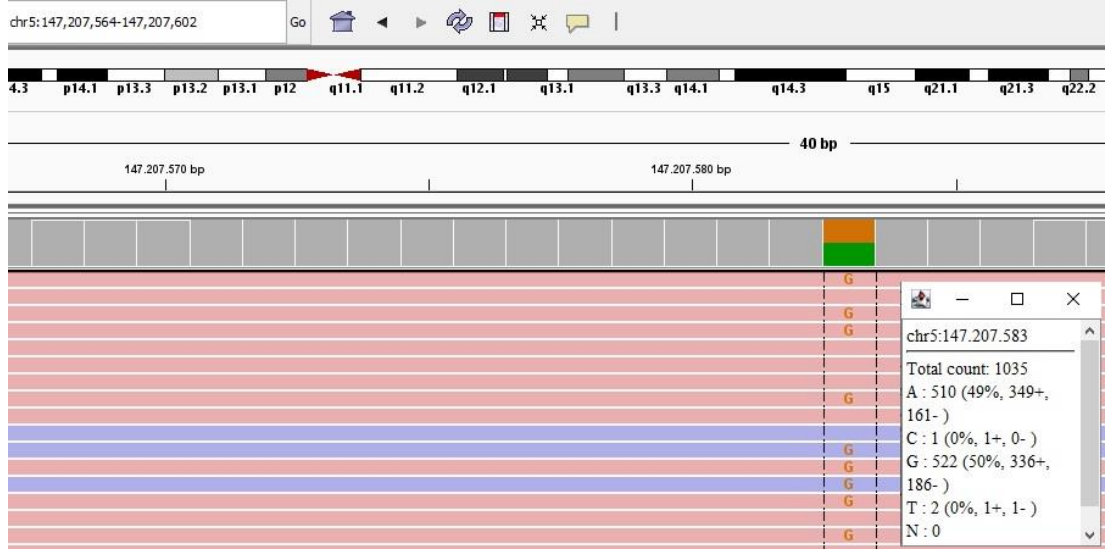
- *SPINK1* geni c.162delT (p.N56Mfs*39) varyantı:



Şekil 4.18. Olgu 33'teki c.162delT (p.N56Mfs*39) varyantının görüntüsü

Olgu 33'te saptanan bu heterozigot varyant, 79 aminoasitlik SPINK1 proteininin 56. aminoasidine karşılık gelen noktadan itibaren çerçeve kaymasına neden olur ve 39 aminoasit sonrasında dur kodonu oluşturarak normal diziden daha uzun olacak şekilde bir dizi kodlar (Şekil 4.18.) (167). Varyant daha önce gnomAD ekzom/genom, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome veritabanlarında bildirilmemiştir. *SPINK1* geninin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları pankreatit yatkınlığı ile ilişkilendirildiğinden, ve bu novel frameshift varyant ACMG kriterlerinden PVS1 ve PM2'yi sağladığından ötürü **olası patojenik** değişiklik olarak sınıflandırılmıştır.

- *SPINK1* geni c.194+2T>C varyantı:



Şekil 4.19. Olgu 44’te saptanan c.194+2T>C varyantının görüntüsü

44. olguda heterozigot olarak tanımladığımız bu değişim özellikle Çinli pankreatit olgularında en sık saptanan *SPINK1* varyantıdır (Şekil 4.19.) (122). Fonksiyonel çalışmalar bu değişimin yabancı tip ve ekzon 3’ün atlandığı iki ayrı transkripte yol açtığını, aberran transkriptin yabancı tipten oldukça yüksek düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir (244, 245). Bu da fonksiyonel tripsin inhibitörünün normalden daha az düzeyde salınımına neden olmaktadır. gnomAD veritabanında oldukça sık olarak bildirilen varyant (MAF: %0,303), *in silico* analiz programlarından CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, EIGEN, EIGEN PC tarafından hastalığa yol açıcı olarak değerlendirilmiştir. ClinVar veritabanında bir çok merkez tarafından patojenik etkili olduğu bildirilmiş ve pankreatit genetiği veritabanında da patojenik olarak tanımlanmıştır (226). Ayrıca Kore’de yapılan bir çalışmada aynı ekzon atlanmasına yol açacak c.194+1G>A değişimi de pankreatit olgularında bildirilmiştir (246). Tüm bu veriler ışığında ACMG kriterlerinden PVS1, PP3 ve PP5’i sağlayan kriterlerini sağlayan varyant **patojenik** olarak sınıflandırılmıştır.

- *CTRC* geni c.703G>A (p.V235I) varyantı:



Şekil 4.20. Olgu 27’de saptanan c.703G>A (p.V235I) varyantının görüntüsü

19 ve 22. olgularda heterozigot, 27. olguda da homozigot olarak saptanan bu değişim (Şekil 4.20.); Hindistan’da yapılan bir çalışmada kronik pankreatit hastalarında en sık saptanan *CTRC* varyantı olarak tanımlanmış ve pankreatit riskinde yaklaşık 7,6 katlık bir artışa yol açtığı hesaplanmıştır (132). Fonksiyonel çalışmalarda varyantın yabancıl tip proteinin ancak %36-55’i kadar etkin olduğu ve pankreatit için orta-düşük riske yol açtığı bildirilmiştir (134). CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, REVEL, MetaSVM, MetaLR, PolyPhen tarafından hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen varyantı Mutation Assessor, DEOGEN2, PROVEAN, MVP ve PrimateAI iyi huylu bir değişim olarak değerlendirmiştir. Varyantın minor allel frekansı gnomAD’de %0,1036 olarak verilmiştir. Pankreatit genetiği veritabanında da 8’i homozigot durumda olmak üzere 45 pankreatit hastasında; ve 1’i homozigot olmak üzere 10 kontrol vakasında olmak üzere pankreatit vakalarında daha sık tespit edildiği bildirilmiştir (226). ACMG kriterlerinden PS3, PS4, PM1, PP3 ve PP5’i sağlayan varyant **patojenik** olarak değerlendirilmiştir.

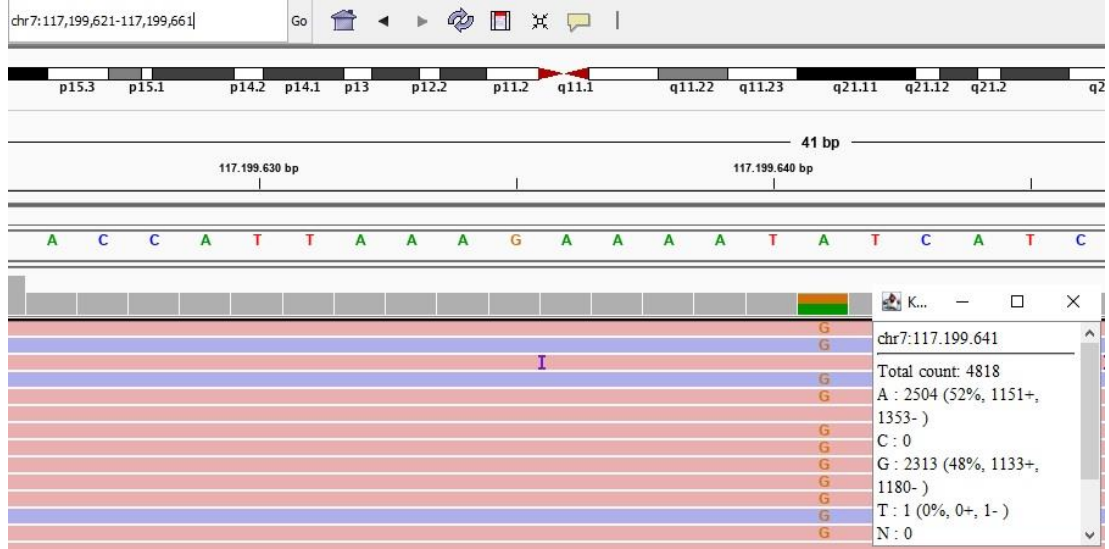
- *CTRC* geni c.180C>T (p.G60=) varyantı



Şekil 4.21. Olgu 21’de saptanan c.180C>T (p.G60=) değişiminin görüntüsü

13, 14, 17, 20, 21, 34, 35, 41, 45 ve 46 nolu olgularda heterozigot, 33 nolu olguda ise homozigot olarak saptanan bu varyantın (Şekil 4.21.); aminoasit dizisinde değişikliğe yol açmamasına, Splice al Exome’da *splicing*’i etkilemediği öngörülmesine ve hatta toplumda oldukça sık olarak da bulunmasına (gnomAD allel sıklığı: %9,385) rağmen; akut ve kronik pankreatitli olgularda kontrollere kıyasla oldukça sık olarak bulunduğu güncel yayınlarda bildirilmiştir (131, 132, 247, 248). *CTRC* varyantları pankreatit kliniğine yol açmaktan ziyade pankreatit risk artışına yol açtığından, varyantın değerlendirilmesinde tek başına benignliği düşündürtecek toplum frekansı kriteri göz önüne alınmamıştır. ACMG kriterlerinden PS4, PP5 ve BP7’yi sağlayan varyant pankreatit yatkınlığı açısından **linik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

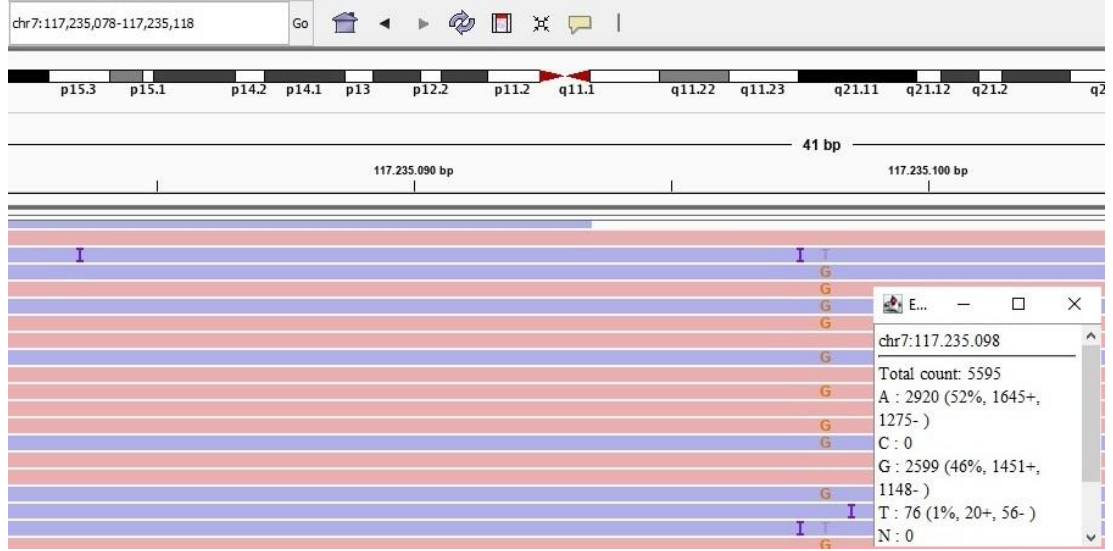
- *CFTR* geni c.1516A>G (p.I506V) varyantı:



Şekil 4.22. 4 nolu olguda saptanan c.1516A>G (p.I506V) varyantının görüntüsü

4 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu varyant; geçmiş kistik fibrozis konsensuslarında klinik bulguya yol açmayan bir polimorfizm olarak bildirilmiştir (Şekil 4.22.) (249). Bu karara yol açan 1990 tarihli makalede bu varyantı p.Phe508del ile birlikte taşıyan hastada klinik bulgunun olmadığı raporlanmıştır (250). Ancak varyant patojenik değişimlerin sık olarak gözlemlendiği bir bölgede bulunmakta olup aynı noktada başka bir aminoasit değişimine yol açan c.1516A>C (p.I506L) varyantı farklı yayınlarda patojenik etkili olarak düşünülmüştür (251, 252). Toplum frekansı gnomAD'de %0,003552, TOPMed Bravo'da %0,03, GME Variome'da %0,35 olarak bildirilmişken; 4.7KJPN, GenomeAsia ve Irainome'da bu varyanta rastlanılmamıştır. *In silico* veritabanlarından CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, PolyPhen, MetaSVM, MetaLR, DEOGEN2, PrimateAI ve MVP tarafından hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen varyantı Mutation Assessor, SIFT4G, PROVEAN ve REVEL iyi huylu değişim olarak değerlendirmiştir. Bu bilgiler ışığında ACMG kriterlerinden PM1, PM2, PM5, PP2, PP3 ve BP6'yı sağlayan varyant, pankreatit riski açısından **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

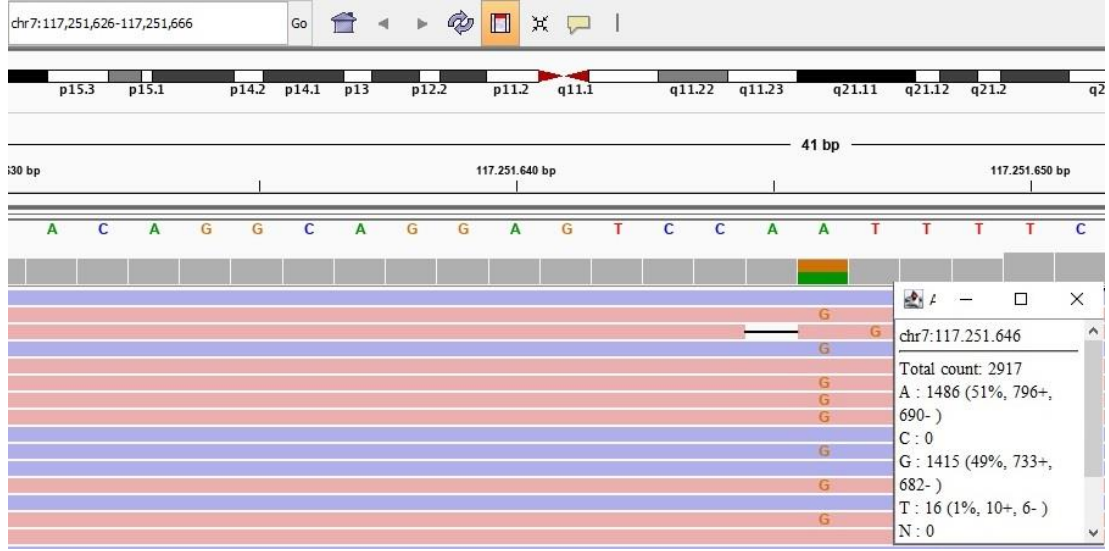
- *CFTR* geni c.2605A>G; (p.I869V) varyantı:



Şekil 4.23. 19 nolu olguda saptanan c.2605A>G (p.I869V) varyantının görüntüsü

19 nolu olguda *CFTR* geninde heterozigot c.2605A>G; (p.I869V) değişimi saptanmıştır (Şekil 4.23.). Varyant daha önce gnomAD ekzom/genom, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome, Iraniome veritabanlarında ve literatürde bildirilmemiş novel bir değişimdir. *In silico* veritabanlarından FATHMM, MVP ve MetaLR tarafından hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen değişikliği; CADD, DANN, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN, EIGEN PC, REVEL, MetaSVM, DEOGEN2, PolyPhen, PROVEAN, SIFT, SIFT4G ve PrimateAI iyi huylu değişim olarak değerlendirmiştir. ACMG kriterlerinden PM2, PP2 ve BP4'ü karşılayan varyant, **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

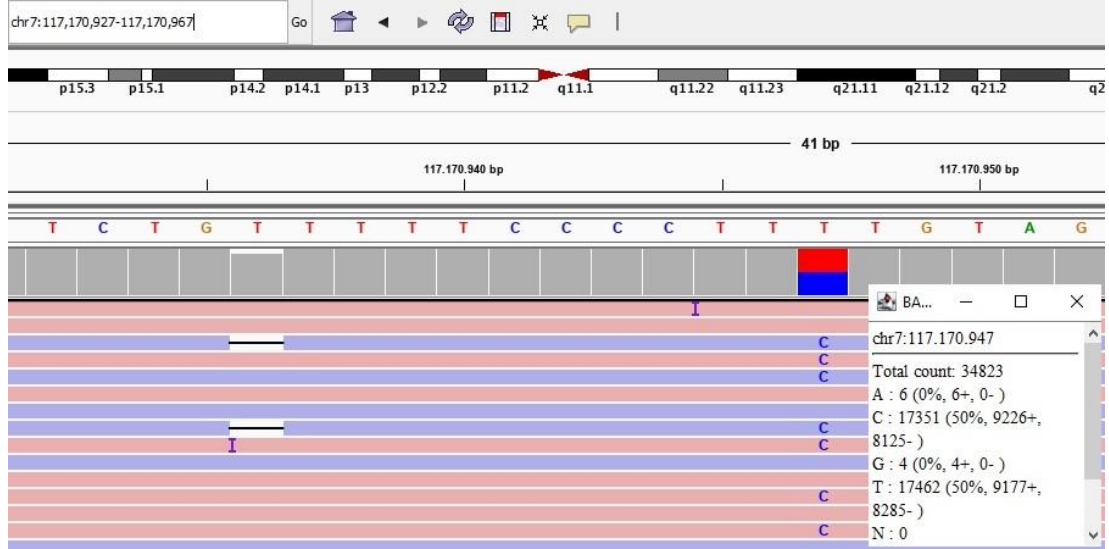
- *CFTR* geni c.3151A>G (p.I1051V) varyantı



Şekil 4.24. 21 nolu olguda saptanan c.3151A>G (p.I1051V) varyantının görüntüsü

21 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu varyant daha önce bir yayında patojenik değişim olarak bildirilmişken, bir diğer yayında bu varyantı p.Phe508del ile birlikte taşıyan olgunun asemptomatik olduğu bildirilmiştir (Şekil 4.24.) (253, 254). Varyant mutasyonların sık olarak gözlemlendiği bölgede bulunmaktadır. gnomAD'de frekansı %0,003552, TOPMed Bravo frekansı %0,0034 iken; 4.7KJPN, GenomeAsia, GME Variome ve Iraniome veritabanlarında varyanta rastlanılmamıştır. *In silico* veritabanlarından CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PolyPhen, MetaSVM, MetaLR, PrimateAI, REVEL ve MVP tarafından hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen varyantı; Mutation Assessor, PROVEAN ve DEOGEN2 iyi huylu değişim olarak değerlendirmiştir. Bu bilgiler ışığında ACMG kriterlerinden PM1, PM2, PP2, PP3 ve BP6'yı sağlayan varyant pankreatit gelişim riski için **olası patojenik** değişiklik olarak sınıflandırılmıştır.

- *CFTR* geni c.274-6T>C varyantı:



Şekil 4.25. 23 nolu olguda saptanan c.274-6T>C varyantının görüntüsü

23 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu değişimin MAF'ı gnomAD veritabanında %0,04613, TOPMed Bravo'da %0,04, Iraniome'da %0,06 olarak verilmiş; 4.7KJPN, Genome Asia ve GME Variome'da ise varyanta rastlanılmamıştır (Şekil 4.25.). *In silico* veritabanlarından DANN ve Splice AI Exome varyantın benign bir değişim olduğu öngörüsünde bulunmuştur. Varyant ClinVar veritabanında farklı merkezler tarafından 5 kez benign, 3 kez de VUS olarak sınıflandırılmış; literatürde de kesinlikle patojenik ve muhtemelen patojenik olmayan olarak farklı sınıflandırmalarla bildirilmiştir (255, 256). Hakkında çelişkili veriler olan ve ACMG kriterlerinden sadece PM2 ile BP4'ü sağlayabilen bu değişim, pankreatit yatkınlığı açısından **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

- *CFTR* geni c.2991G>C (p.L997F) varyantı



Şekil 4.26. 25 nolu olguda saptanan c.2991G>C (p.L997F) varyantının görüntüsü

25 ve 37. olgularda heterozigot bulunan varyant; mutasyonların sık olduğu bölgededir (Şekil 4.26.). Frekansı normal popülasyonda kistik fibrozis popülasyonuna oranla daha yüksektir (gnomAD frekansı: % 0,22) (257). Varyant yenidoğan tarama testinde risk artışı nedeniyle incelenen olgularda yüksek sıklıkta saptanmış, ancak bu olgularda klasik kistik fibrozis fenotipi oluşmadığı gözlenmiştir (258). Klasik kistik fibrozis fenotipine yol açmadığı öngörülen bu varyant pankreatik yetmezlik gibi non-klasik fenotiplere yol açabilir (143, 259, 260). Varyantın yenidoğanda hipertripsinojenemi yapması ve rekürren pankreatitte sık saptanması, duktal kanal fonksiyonunda bozulmaya yol açtığını düşündürmektedir. Ayrıca fonksiyonel çalışmalarda pankreas kanal çapında azalmaya yol açarak bikarbonat geçirgenliğini etkilediğinin bulunması da duktal patojeniteyi destekler niteliktedir (143, 261). CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, PolyPhen, REVEL, MetaSVM, MetaLR, DEOGEN2 ve MVP'nin patojenik öngördüğü varyantı; Mutation Assessor, EIGEN, PROVEAN ve PrimateAI iyi huylu değişim olarak değerlendirmiştir. Pankreatit yatkınlığı açısından ACMG standartları ile değerlendirildiğinde bu varyant PS3, PM1, PP2, PP3, PP5 ve BS2'yi sağladığı için **olası patojenik** olarak sınıflandırılmıştır.

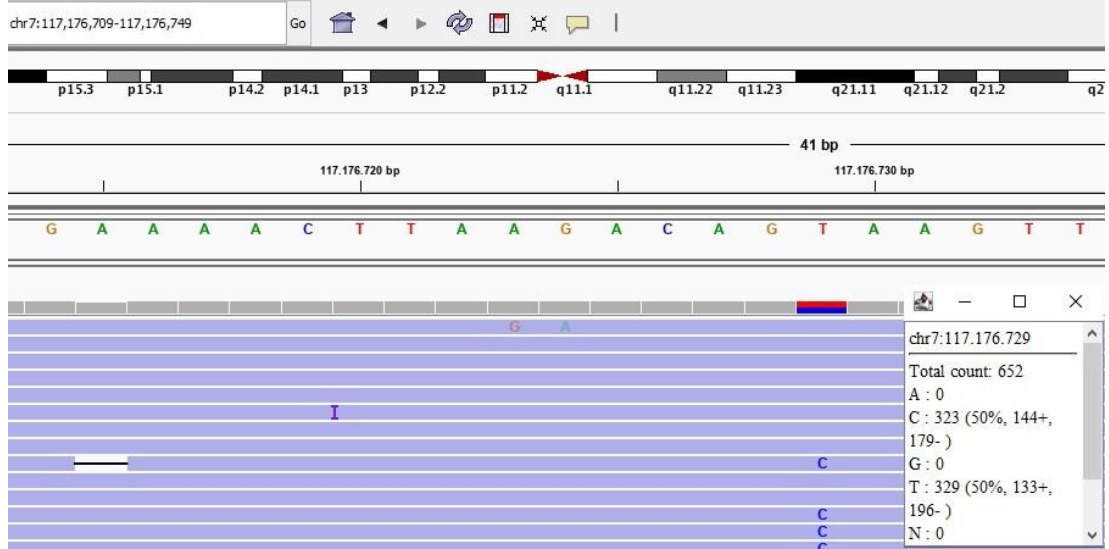
- *CFTR* geni c.4220T>C (p.M1407T) varyantı



Şekil 4.27. 27 nolu olguda saptanan c.4220T>C varyantının görüntüsü

27 nolu olguda heterozigot olarak tespit edilen bu değişim daha önce gnomAD, TOPMed, 4.7KJPN, GenomeAsia ve Iranianome veritabanlarında hiç bildirilmemiş olmakla birlikte; GME Variome veritabanında toplum frekansı %0,05 olarak verilmiştir (Şekil 4.27.). Varyant daha önce Amerika Birleşik Devletleri orijinli bir pankreatit araştırmasında klinik önemi bilinmeyen, Portekiz’de yapılan bir çalışmada ise olası patojenik değişim olarak sınıflandırılmıştır (262, 263). *In silico* değerlendirme araçlarından CADD, MutationTaster, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, EIGEN PC, SIFT, SIFT4G, REVEL, MetaLR ve MVP’nin patojenik öngördüğü varyantı; DANN, DEOGEN2, MetaSVM, Mutation Assessor, EIGEN, PolyPhen ve PrimateAI iyi huylu değişim olarak değerlendirmiştir. ACMG kriterlerinden PM2, PP2 ve PP3’ü sağlayabilen bu değişim **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

- *CFTR* geni c.869+2T>C varyantı



Şekil 4.28. 31 nolu olguda saptanan c.869+2T>C varyantının görüntüsü

31 nolu olguda heterozigot olarak saptanan bu değişim *canonical site*'ı etkilemekte olup; alternatif splicing bozan *null* (geçersiz) bir varyanttır (Şekil 4.28.). Ayrıca gnomAD max, gnomAD aggregated, TOPMed Bravo, 4.7 KJPN, GenomeAsia, GME Variome ve Iraniome veritabanlarında daha önce hiç bildirilmemiş *novel* bir değişimdir. *In silico* veritabanlarından CADD, DANN, MutationTaster, FATHMM-MKL, EIGEN ve EIGEN PC tarafından hastalıkla ilişkili olabileceği öngörülen varyant; ACMG kriterlerinden PVS1, PM2, PP3'ü sağladığı için **patojenik** bir değişim olarak sınıflandırılmıştır.

- *CFTR* geni c.358G>A (p.A120T) varyantı:



Şekil 4.29. 44 nolu olguda tespit edilen c.358G>A varyantının görüntüsü

44 nolu olguda heterozigot olarak tespit edilen bu missense değişim *CFTR* geninin patojenik varyantlarının sık gözleendiği bir bölgesinde lokalizedir (Şekil 4.29.). Varyant toplum veritabanlarında oldukça az sıklıkta belirtilmiş olmakla beraber (gnomAD: %0,01381), *CFTR2* veritabanında varyantı taşıyan bazı hastalarda fenotip gözlenirken bazı olgularda ise gözlenmediği belirtilmiştir. *In silico* değerlendirme programlarından CADD, DANN, EIGEN, EIGEN PC, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, MVP, MetaLR, MetaSVM, MutPred, MutationTaster, Revel, SIFT, SIFT4G tarafından hastalıkla ilişkili olduğu öngörölmüş olan varyantı Mutation Assesor ve PrimateAI iyi huylu değişim olarak yorumlamıştır. ACMG kriterlerinden PM1, PM2, PP2, PP3 ve PP5'i sağlayan variant, **olası patojenik** değişim olarak sınıflandırılmıştır.

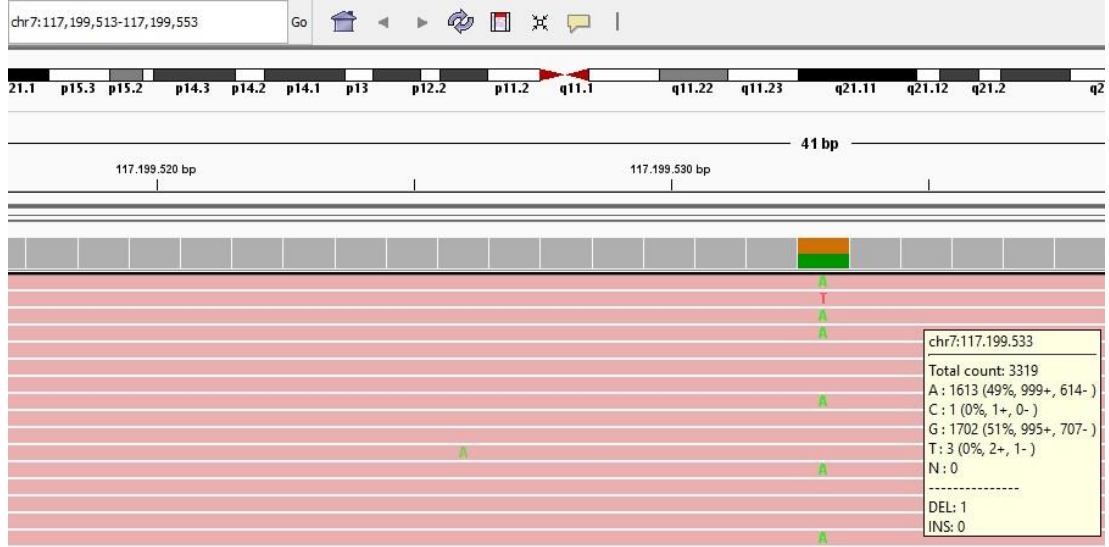
- *CFTR* geni IVS8-5T varyantı:



Şekil 4.30. 38 nolu olguda tespit edilen 5T varyantının görüntüsü

36, 38 ve 46 nolu olgularda *CFTR* geni 5T/7T varyantları tespit edilmiştir (Şekil 4.30.). 5T alleli toplumda oldukça sık rastlanan bir varyant olsa da allel frekansında artma kronik idiyopatik pankreatit de dahil olmak üzere *CFTR* ilişkili hastalıklarda bildirilmiştir (140, 141, 147). 5T varyantının 12TG / 13TG tekrarlarıyla birlikteyken patojenik etki gösterip; 11TG varyantıyla muhtemelen hastalığa yol açmayacağını bildiren çalışmalar vardır; ancak *CFTR2* veritabanı TG dizilerinden bağımsız olarak tüm *CFTR* ilişkili hastalıklar fenotipine yol açabileceklerini belirtilmiştir (227, 264). Büyük çaplı çalışmalar 5T'nin pankreatit ilişkili olmadığını ve *CFTR2* veritabanı da 5T varyantı taşıyan olguların yüksek ihtimalle pankreas yetmezliği ile karşılaşmayacakları bildirmişse de; izole 5T/7T varyantı ile pankreatiti ilişkilendiren yayınlar da mevcuttur (141, 227, 265-267). Güncel bir yayında ise 277 kronik pankreatitli çocukta 5T alleli varlığının hastalığın seyri üzerine de bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (268). Bu bilgilerle 5T varyantı pankreatit riski açısından **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

- *CFTR* geni c.1408G>A (p.V470M) varyantı:



Şekil 4.31. 38 nolu olguda saptanan c.1408G>A (p.V470M) varyantının görüntüsü

Son olarak *CFTR* geninde 4, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 21, 25, 26, 28, 32, 35, 38, 39, 41, 44, 47, 48 ve 49. olgularda heterozigot; 15, 30, 34, 42 ve 43. olgularda ise homozigot olarak c.1408G>A (p.V470M) varyantı saptanmıştır (Şekil 4.31.). Varyant *CFTR* geninde oldukça sık saptanan (gnomAD: %48,65) ve klasik kistik fibrozis fenotipine yol açmayan benign bir değişimdir (227). Ancak güncel bir metaanaliz 470. pozisyondaki M varyantını kronik pankreatit riski ile ilişkilendirmiştir (146). Bu yüzden varyant pankreatit riski açısından **klirik önemi belirsiz değişiklik** olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 4.2. Olgularda saptanan *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genleri varyantlarının özellikleri***PRSSI*: NM_002769.4**

Varyant	Tipi	dbSNP	MAF (%)	CADD	PolyPhen	SIFT	MT	PhlyoP	Sımf	Olgu	Zigosite
#1 c.310C>G; (p.L104V)	missense	-	N/A	7,443	B	T	DC	-0,35	VUS	#10	Heterozigot
#2 c.365G>A; (p.R122H)	missense	rs111033565	0,001062	7,883	B	T	DC	0,14	P	#4	Heterozigot
										#13	Heterozigot
										#24	Heterozigot
										#30	Heterozigot
#3 c.62A>C; (p.D21A)	missense	-	N/A	23,2	PD	D	DC	4,039	P	#32	Heterozigot
#4 c.364C>T; (p.R122C)	missense	rs111033568	0,003193	18,36	PD	T	DC	0,068	P	#34	Heterozigot
#5 c.592-4C>T	intronik	rs375342697	0,003182	-	-	-	-	-	VUS	#48	Heterozigot

***SPINK1*: NM_003122.4**

Varyant	Tipi	dbSNP	MAF (%)	CADD	PolyPhen	SIFT	MT	PhlyoP	Sımf	Olgu	Zigosite
#1 c.181T>C; (p.C61R)	missense	-	N/A	23,8	PD	D	DC	4,349	VUS	#29	Heterozigot
#2 c.162delT; (p.N56Mfs*39)	frameshift	-	N/A	-	-	-	-	-	LP	#33	Heterozigot
#3 c.194+2T>C	splice site	rs148954387	0,03033	24,3	-	-	DC	4,349	P	#44	Heterozigot

CTRC: NM_007272.3

Varyant	Tipi	dbSNP	MAF (%)	CADD	PolyPhen	SIFT	MT	PhlyoP	Smif	Olgu	Zigosite	
#1	c.703G>A; (p.V235I)	missense	rs140993290	0,1036	25,4	PD	D	DC	3,662	P	#19 #22 #27	Heterozigot Heterozigot Homozigot

CFTR: NM_000492.3

Varyant	Tipi	dbSNP	MAF (%)	CADD	PolyPhen	SIFT	MT	PhlyoP	Smif	Olgu	Zigosite	
#1	c.1516A>G; (p.I506V)	missense	rs1800091	0,003552	23,7	PD	D	DC	8,790	VUS	#4	Heterozigot
#2	c.2605A>G; (p.I869V)	missense	-	N/A	10,65	B	T	P	-0,006	VUS	#19	Heterozigot
#3	c.3151A>G; (p.I1051V)	missense	rs374403559	0,003552	26,4	PD	D	DC	9,265	LP	#21	Heterozigot
#4	c.274-6T>C	splice site	rs371315549	0,046130	-	-	-	-	-	VUS	#23	Heterozigot
#5	c.2991G>C; (p.L997F)	missense	rs1800111	0,222200	23,7	PD	D	DC	1,651	LP	#25 #37	Heterozigot Heterozigot
#6	c.4220T>C; (p.M1407T)	missense	rs1328842974	N/A	23,1	B	D	DC	7,323	VUS	#27	Heterozigot
#7	c.869+2T>C	splice site	-	N/A	28,5	-	-	DC	7,544	P	#31	Heterozigot
#8	c.358G>A; (p.A120T)	Missense	rs201958172	0,013810	23,4	PD	D	DC	9,516	LP	#44	Heterozigot

PD: Probably Damaging, D: Damaging, DC: Disease Causing, P: Polymorphism, B: Benign, T: Tolerated
N/A: Not Available, VUS: Variant of unknown significance LP: Likely Pathogenic, PA: Polymorphism automatic P: Pathogenic

Tablo 4.3. Toplumda yaygın bulunan varyantların özellikleri ve vakalarımızda tespit edilme durumları

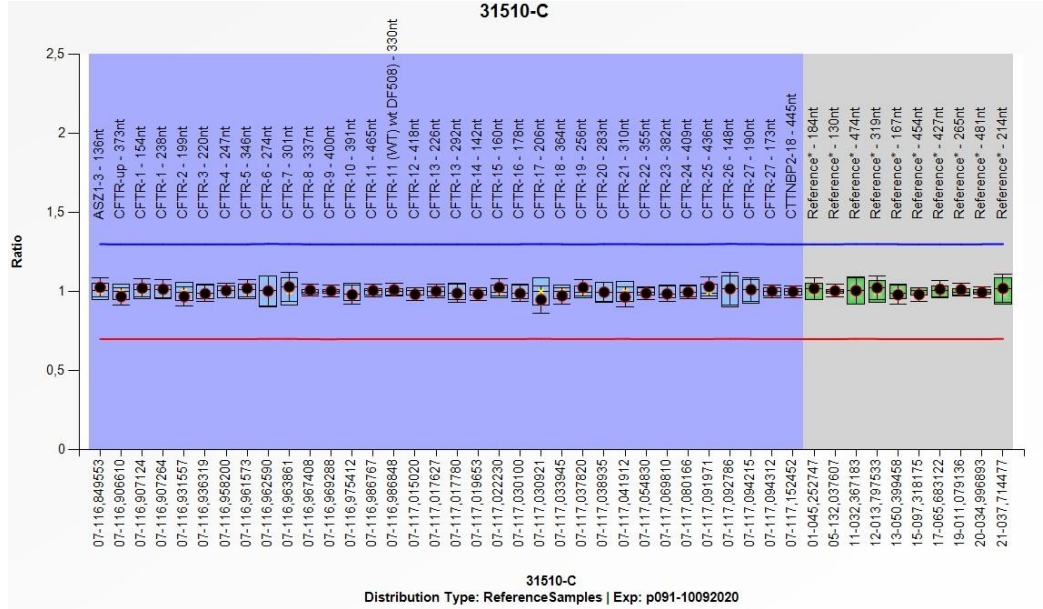
TOPLUMDA SIK GÖRÜLEN VARYANTLAR

Varyant	Tipi	dbSNP	MAF (%)	CADD	PolyPhen	SIFT	MT	PhlyoP	Sınıf	Olgu	Zigosite
#1 CTRC: c.180C>T; (p.G60G)	Sessiz	rs497078	9,385	-	-	-	-	-	VUS	#13	Heterozigot
										#14	Heterozigot
										#17	Heterozigot
										#20	Heterozigot
										#21	Heterozigot
										#33	Homozigot
										#34	Heterozigot
										#35	Heterozigot
										#41	Heterozigot
										#45	Heterozigot
										#46	Heterozigot
#2 CFTR: c.1408G>A; (p.V470M)	missense	rs213950	48,65	21,3	B	T	PA	2,573	VUS	#4, #7	Heterozigot
										#8, #10	Heterozigot
										#14, #16	Heterozigot
										#17, #21	Heterozigot
										#25, #26	Heterozigot
										#28, #32	Heterozigot
										#35, #38	Heterozigot
										#39, #41	Heterozigot
										#44, #47	Heterozigot
										#48, #49	Heterozigot
										#15, #30	Homozigot
#34, #42	Homozigot										
#43	Homozigot										
#3 CFTR: IVS8-5T	intronik	-	N/A	-	-	-	-	-	VUS	#36	Heterozigot
										#38	Heterozigot
										#46	Heterozigot

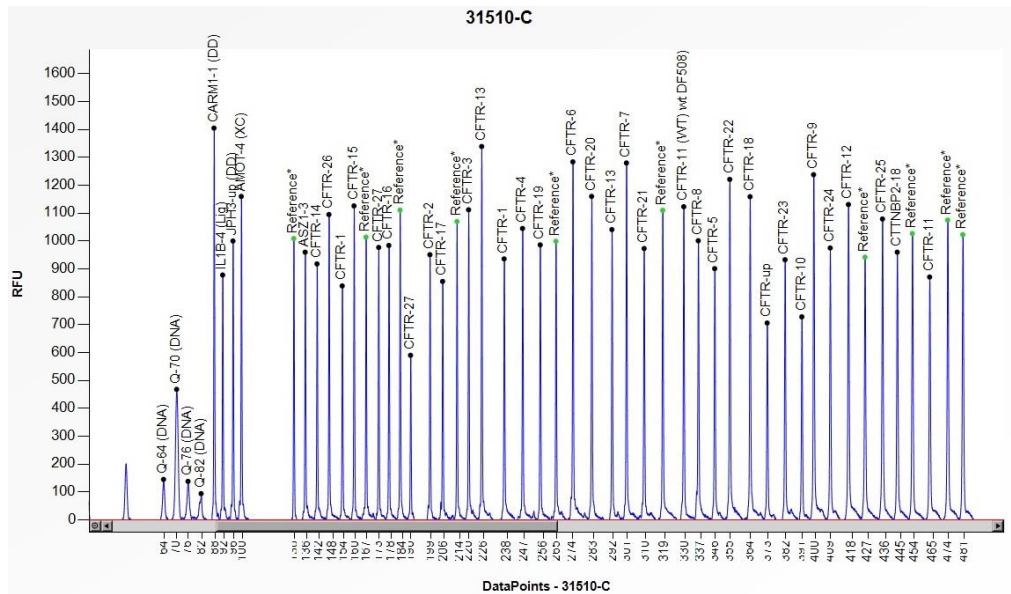
VUS: Klinik Önemi Belirsiz Varyant, B: Benign, T: Tolarated, PA: Polymorphism automatic, N/A: Not Available

4.4.2. Multipl Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu Analiz Sonuçları

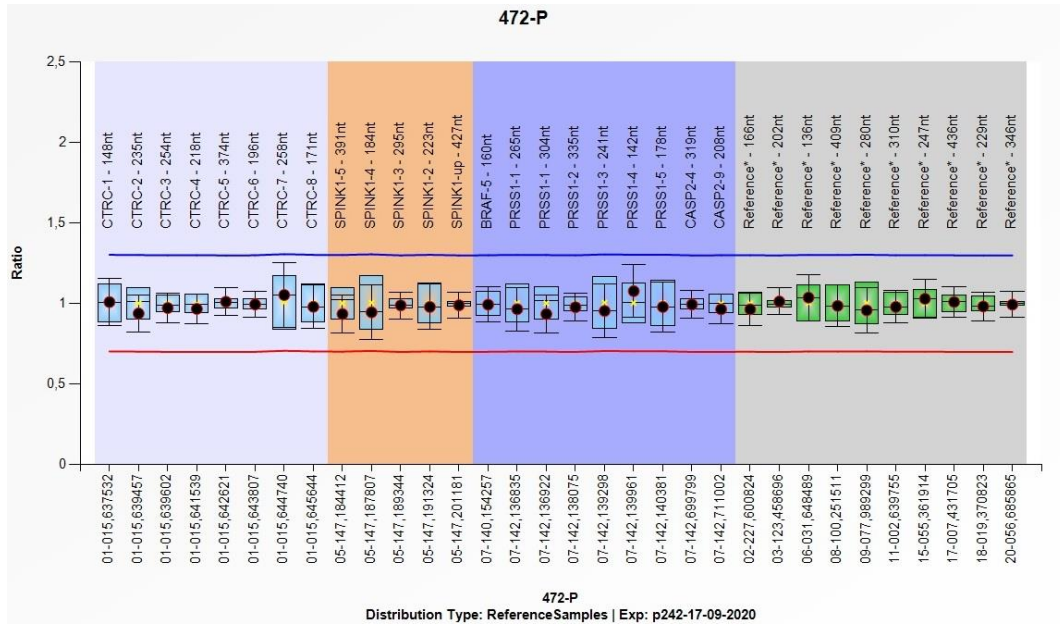
PRSSI, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genleri için MLPA analizi planlanan 49 olgunun 47'sinde bu genleri ilgilendiren bir kopya sayısı değişimine rastlanılmazken, 2 olguda MLPA analizi sonucu bilgilendirici olmamıştır (Şekil 4.32-35.).



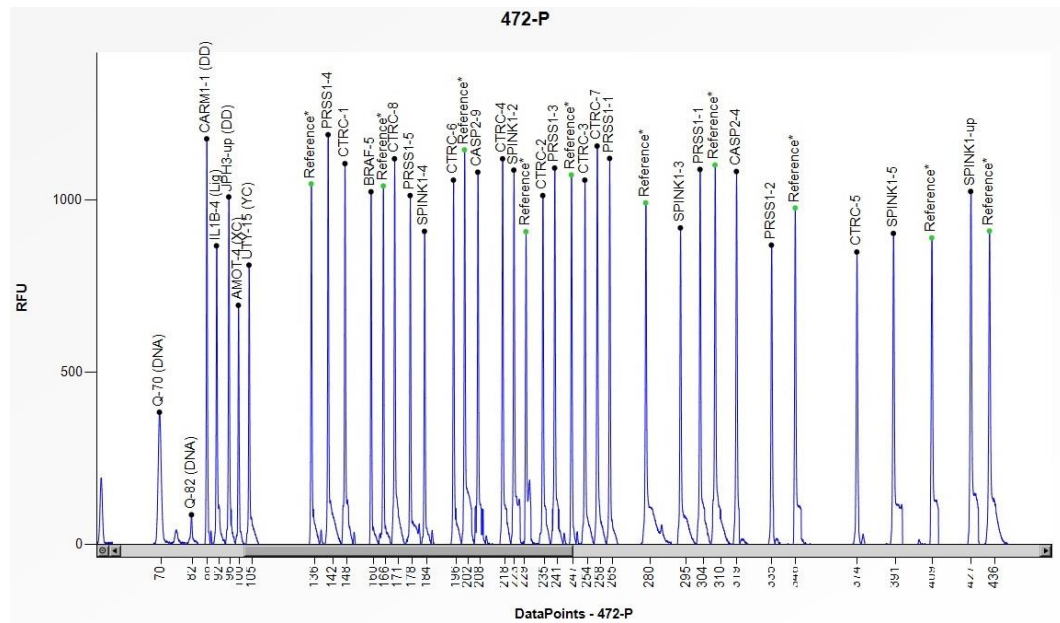
Şekil 4.32. *CFTR* geni MLPA analizi normal olan bir olgunun görüntüsü



Şekil 4.33. *CFTR* geni MLPA analizi normal olgunun elektroferogram görüntüsü



Şekil 4.34. *CTRC*, *SPINK1*, *PRSS1* genleri MLPA analizi normal olgunun görüntüsü



Şekil 4.35. *CTRC*, *SPINK1*, *PRSS1* genleri MLPA analizi normal bir olgunun elektroferogram görüntüsü

4.5. Moleküler Sonuçların Klinik Özelliklerle Karşılaştırılması

Tablo 4.4. Genetik risk faktörleri saptanan olguların genotipleri ve klinik özelliklerinin karşılaştırılması

Gen	Varyant	Zigosite	Olgu	Tanı Türü	İlk Bulgu Yaşı	Ağrı	Steatore	Diabetes Mellitus	Ek Fenotip
<i>PRSSI</i>	c.310C>G	Het.	#10	AP	69	-	-	*	-
	c.365G>A	Het.	#13	KP	9	-	-	-	-
		Het.	#24	KP	17	+	+	+	-
		Het.	#30	KP	14	-	-	-	-
		Het.	#32	KP	14	-	-	+	-
	c.364C>T	Het.	#34	RAP	7	-	-	-	-
	c.592-4C>T	Het.	#48	RAP	28	-	-	-	-
<i>SPINK1</i>	c.181T>C	Het.	#29	RAP	23	+	-	-	-
	c.162delT	Het.	#33	KP	9	+	-	-	-
<i>CTRC</i>	c.703G>A	Het.	#22	KP	20	+	+	+	-
	c.3151A>G	Het.	#21	AP	45	-	-	-	-
<i>CFTR</i>	c.274-6T>C	Het.	#23	RAP	40	-	+	-	-
	c.2991G>C	Het.	#25	KP	19	+	-	-	NP, KRS
		Het.	#37	AP	15	-	-	-	-
	c.869+2T>C	Het.	#31	RAP	7	-	-	-	-
<i>PRSSI + CFTR</i>	c.365G>A	Het.	#4	RAP	5	-	-	-	ALL
	c.1516A>G	Het.							
<i>SPINK1 + CFTR</i>	c.194+2T>C	Het.	#44	RAP	13	+	-	-	-
	c.358G>A	Het.							
<i>CTRC + CFTR</i>	c.703G>A	Het.	#19	KP	28	-	-	-	-
	c.2605A>G	Het.							
	c.703G>A	Hm.	#27	AP	4	-	-	-	-
	c.4220T>C	Het.							

Het.: Heterozigot Hm.: Homozigot KRS: Kronik Rinosinüzit ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi
AP: Akut Pankreatit RAP: Rekürren Akut Pankreatit KP: Kronik Pankreatit NP: Nazal Polipozis
* Olguda pankreatit başlangıcı öncesi DM tanısı olduğu için bu değerlendirme yapılmamıştır.

Patojenik olduğu bilinen *PRSSI* varyantlarını taşıyan 6 olgunun hepsinde semptomların pediatrik dönemde başladığı belirlendi. *PRSSI* geninin patojenik varyantına ek olarak *CFTR* geninde de klinik önemi bilinmeyen bir değişim saptanan 4 nolu olgumuzda pankreatit ataklarının diğer *PRSSI* mutant olgulardan erken olarak, 5 yaşında başladığı görüldü. *PRSSI* genine ait varyantların saptandığı 8 olgudan sadece, c.365G>A patojenik varyantını taşıyan kronik pankreatitli 24 nolu olgunun ilk semptomundan 24 yıl sonraki değerlendirmemizde devam eden ağrıları, steatoresi ve endokrin yetmezliği olduğu tespit edildi. Segregasyon analizi sırasında bu olgunun 12 yaşında asemptomatik olan oğlunda da aynı genetik varyasyon tespit edildi. İlk semptomdan sırasıyla 9, 4 ve 7 yıl sonra değerlendirdiğimiz patojenik *PRSSI* varyantı taşıyan 13, 30 ve 32. nolu kronik pankreatit hastalarımızda ise ağrı, steatore ve endokrin yetmezlik bulgularına rastlanmadı (Tablo 4.4.).

SPINK1 varyasyonları tespit edilen 3 olgunun hepsinde kronik ağrı olduğu öğrenilirken, semptomların başlamasının 2, 3 ve 6 yıl sonrasın değerlendirilen bu olguların hiçbirinde ekzokrin ve endokrin yetmezlik bulguları görülmedi (Tablo 4.4.).

CTRC geninde patojenik varyant saptanan 3 olgunun 2'sinde eşlik eden klinik önemi belirsiz *CFTR* varyantları varken, sadece 1 olguda tek başına patojenik *CTRC* varyantı görüldü. Bu olgulardan patojenik *CTRC* varyantını tek başına heterozigot taşıyan 22 nolu kronik pankreatitli olguda semptomların başlamasından 18 yıl sonraki değerlendirmemizde devam eden ağrılarına ek olarak ekzokrin/endokrin yetmezliğinin bulunduğu görüldü. Hem patojenik c.703G>A varyasyonunu homozigot olarak, hem de *CFTR* geninde klinik önemi bilinmeyen heterozigot c.4220T>C dönüşümünü taşıyan 27 nolu olgumuzda klinik bulguların genetik etiyolojik faktör bulunan diğer vakalara göre en erken yaşta, 4 yaşında başladığı görüldü. Olgunun *CTRC* geninin c.703G>A varyantını heterozigot konumda bulundurduğunu tespit ettiğimiz 35 yaşındaki babası ile *CTRC* geninin c.703G>A ve *CFTR* geninin c.4220T>C varyantlarını heterozigot olarak bulunduran 35 yaşındaki annesi ise pankreatit açısından asemptomatikti (Tablo 4.4.).

CFTR varyantlarına sahip 9 olgunun 5'inde tek başına *CFTR* varyasyonları bulunurken diğer 4'ünde ek olarak *PRSSI*, *SPINK1* ya da *CTRC* varyantları bulundu. İzole *CFTR* varyasyonu taşıyan olgulardan c.2991G>C varyantını heterozigot olarak

taşıyan 25 numaralı kronik pankreatit olgusunda devam eden ağrılara ek olarak nazal polipozis ve kronik rinosinüzit olduğu öyküsü alındı. Ancak alerjik astım tanısı da olan bu olguda nazal polipozis varlığı, tek başına saptanan bu *CFTR* varyantına bağlanamadı. Segregasyon analizi de planlanan bu olgunun 49 yaşındaki asemptomatik babasında da c.2991G>C dönüşümü heterozigot olarak tespit edildi. Patojenik olarak sınıflandırabildiğimiz tek *CFTR* varyantını taşıyan 31 nolu olguda semptomların *CFTR* varyantı taşıyan diğer olgulardan daha erken olarak, 7 yaşında başladığı görüldü (Tablo 4.4.).

Kronik pankreatitli vakalarımızdan *PRSSI* patojenik varyantını tek başına taşıyan 4 olgunun 1 (%25) 'inde kronik ağrı, 1 (%25)'inde steatore ve 2 (%50)'sinde bozulmuş glukoz metabolizması varken; herhangi bir gende klinikle ilişkili olabilecek varyant tespit edilmeyen kronik pankreatitli 14 olgumuzun 7 (%50)'sinde devam eden ağrı, 4 (%28,8)'ünde steatore ve 2 (%14,3)'sinde bozulmuş glukoz metabolizması tespit edildi.

Tablo 4.5. Pankreatik divisumlu olguların genetik analiz sonuçları

Olgu	<i>PRSSI</i> Dizi	<i>SPINK1</i> Dizi	<i>CTRC</i> Dizi	<i>CFTR</i> Dizi	<i>PRSSI</i> CNV	<i>SPINK1</i> CNV	<i>CTRC</i> CNV	<i>CFTR</i> CNV	<i>CTRC</i> c.180C>T	<i>CFTR</i> Poli-T	<i>CFTR</i> p.V470M
#11	n	n	n	n	n	n	n	n	n/n	7T/9T	n/n
#14	n	n	n	n	n	n	n	n	+ / n	7T/7T	+ / n
#25	n	n	n	c.2991G>C	n	n	n	n	n/n	7T/9T	+ / n
#28	n	n	n	n	n	n	n	n	n/n	7T/7T	+ / n
#31	n	n	n	c.869+2T>C	n	n	n	n	n/n	7T/7T	n/n
#35	n	n	n	n	n	n	n	n	+ / n	7T/7T	+ / n
#45	n	n	n	n	n	n	n	n	+ / n	7T/7T	+ / n
#46	n	n	n	n	n	n	n	n	+ / n	5T/7T	n/n
n: Normal allel, +: Belirtilen varyantın olguda bulunması											

Pankreatik divisum saptanan 8 olgumuzun 2 (%25)'sinde *CFTR* geninin dizi varyasyonları saptandı (Tablo 4.5.). Pankreatik divisumu olmadığı saptanan 37 olgunun ise 6 (%16,2)'sında *CFTR* geni dizi varyasyonları tespit edildi. Pankreatik divisumlu vakalarda *CFTR* geni dizi varyantları pankreatik divisum bulunmayan pankreatit olgularından daha sık olarak görülmüşken (%25 ve %16,2), iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0,618$) bulunmadı.

Toplumda yaygın bulunan varyantlar açısından da değerlendirildiğinde, pankreatik divisumlu idiyopatik pankreatit vakalarında *CTRC* geni c.180C>T varyantının allel frekansı 4/16 (%25), *CFTR* geni IVS8-5T varyantının allel frekansı 1/16 (%6,3) ve *CFTR* geni p.V470M varyantının allel frekansı 5/16 (%31,3) olarak tespit edildi. Yaygın varyantların allel frekansı pankreatik divisumsuz grupta incelendiğinde; *CTRC* geni c.180C>T varyantının allel frekansı 8/70 (%11,4), *CFTR* geni IVS8-5T varyantının allel frekansı 2/74 (%2,7) ve *CFTR* geni p.V470M varyantının allel frekansı 23/74 (%31,1) olarak tespit edildi.

Toplumda yaygın olarak bulunan varyasyonlar da pankreatik divisum vakalarında diğer pankreatit vakalarından daha sık olarak gözlenmiş, ancak vaka sayısı kısıtlı olduğu için bu varyantların klinik etkisi biyoistatistiksel olarak kanıtlanamamıştır (Pankreatik divisumu bulunan ve bulunmayan vakalarda allel frekansı karşılaştırmasında p değerleri: *CTRC* geni c.180C>T varyantı $p=0,224$; *CFTR* geni IVS8-5T varyantı $p=0,448$; *CFTR* geni p.V470M varyantı allel frekansı $p=1$). Pankreatik divisumlu vakalarla kontrollerimizi yaygın varyantlar açısından kıyasladığımızda ise *CTRC* geni c.180C>T varyantı ve *CFTR* geni IVS-5T varyantı daha yüksek oranda bulunmakla beraber istatistiksel olarak risk artışı kanıtlanamamıştır (sırasıyla $p=0,057$ ve $p=0,151$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Yapılan istatistiksel analizlerin sonuçları gösterilmiştir

	CFTR: IVS8-5T Alleli	Toplam	p Değeri
Vaka Grubu	3	98	0,118
Kontrol Grubu	1	188	

	CTRC: c.180C>T Alleli	Toplam	p Değeri
Vaka Grubu	12	94	0,353
Kontrol Grubu	393	4186	

	CFTR: Dizi Varyantı	Toplam	p Değeri
P. Divisumlu Vaka Grubu	2	8	0,618
P. Divisumsuz Vaka Grubu	6	37	

	CFTR: IVS8-5T Alleli	Toplam	p Değeri
P. Divisumlu Vaka Grubu	1	16	0,151
Kontrol Grubu	1	188	

	CTRC: c.180C>T Alleli	Toplam	p Değeri
P. Divisumlu Vaka Grubu	4	16	0,057
Kontrol Grubu	393	4186	
P. Divisum: Pankreatik Divisum			

5. TARTIŞMA

5.1. Moleküler Genetik Analizlerin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Pankreatit olgularında bugüne kadar yapılan bilimsel çalışmalarda farklı oranlarda genetik varyasyonlara rastlanmıştır. Çalışmalarda farklı oranlarda varyantların saptanması; araştırmaların planlandığı toplumların etnik özellikleri kadar, araştırmaya dahil edilen olguların demografik/klinik özellikleri ve çalışmada kullanılan genetik yöntemlerin özellikleri ile araştırmacıların bildirmeyi uygun buldukları varyasyonlarla da ilişkilidir. Bugüne kadar planlanan çalışmaların bir kısmında sadece pediatrik ya da sadece erişkin hasta popülasyonları, veya bizim çalışmamız gibi her iki grup birden araştırmalara dahil edilmiştir. Çalışmaların önemli bir kısmı sadece kronik pankreatit olgularına odaklanmışken, çok az sayıda çalışma bütün pankreatit sınıflarını araştırmaya dahil etmiştir. Bununla beraber; bazı çalışmalar bütün diğer risk faktörlerinin dışlandığı idiyopatik pankreatit vakalarında araştırma yapmışken, bir kısmında sigara veya alkol kullanımı gibi risk faktörlerini bulduran olgularda da ek genetik risk faktörleri değerlendirilmiştir. Erken dönem çalışmalarda tüm gen dizi analizleri yerine özellikle vakalarda sıkça saptanan varyantlar açısından genetik incelemeler yapılmışken; daha güncel çalışmalarda sekans varyantları yeni nesil dizileme yöntemleri ile araştırılmıştır. Ancak çok az sayıda çalışmada pankreatit ilişkili kopya sayısı değişimleri incelemiştir. Bütün bunlara ek olarak araştırmacıların bir kısmı sık saptanan ve klinik önemi henüz net bilinmeyen varyasyonları da pozitif vaka saptama oranlarına ekledikleri için; literatürde birbirlerinden çok farklı genetik varyant saptanma oranları mevcuttur.

Planladığımız bu çalışmada idiyopatik pankreatit başlığı altında alkol kötüye kullanımı ve devam eden aşırı sigara kullanımı gibi çevresel risk faktörlerinin de ekarte edildiği kronik pankreatit, rekürren akut pankreatit ya da akut pankreatitli çocuk ve erişkin hastalarda *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC*, *CFTR* genlerinin NGS yöntemiyle dizi varyantları ile MLPA yöntemiyle kopya sayısı varyasyonları araştırılmış ve saptanan patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz varyantlar bildirilmiştir.

5.1.1. *PRSSI* Varyantlarının Değerlendirilmesi

Literatürde *PRSSI* geni dizi varyasyonlarını araştıran çalışmalar incelendiğinde, farklı toplumlarda ve tanı gruplarında %0-31,3 oranında varyant tespit edildiği bildirilmiştir. En yüksek tanı oranı %31,3 ile rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit hastalarında inceleme planlayan Giefer ve arkadaşlarına aitken; Garg ve arkadaşları 56 rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit, Evans ve arkadaşları 45 rekürren akut pankreatit, Jalaly ve arkadaşları 26 idiyopatik kronik pankreatit, Poddar ve arkadaşları 40 idiyopatik kronik pankreatit, Abu-El-Haija ve arkadaşları 31 rekürren akut pankreatit olgularının hiçbirinde *PRSSI* geni dizi varyantları tespit edilmediğini bildirmişlerdir (Tablo 5.1.) (52, 206, 241, 269, 270). Masson ve arkadaşlarının 253 idiyopatik kronik pankreatitli olguda yaptıkları çalışmada araştırmacılar ayrıca 4'ü duplikasyon 9'u triplikasyon olmak üzere 13 (%5,1) kopya sayısı değişimi bildirmişlerdir (144). Bu oran, pankreatitli hastalarda *PRSSI* geni CNV'leri için bugüne kadar bildirilen en yüksek orandır (144). Wang ve arkadaşları ise çalıştıkları 75 vakanın 4'ünde tek kopya *PRSSI* saptarken bir olguda kopya sayısını 5 olarak tespit etmişlerdir (271). *PRSSI* geni kopya sayısı değişimlerini araştıran başka bir çalışma 93 idiyopatik pankreatit olgusunda CNV tespit edilmemesiyle sonuçlanmıştır (246).

Bizim çalışmamızda ise *PRSSI* geni MLPA analizinden sonuç alınabilen 47 olgunun hiçbirinde CNV tespit edilmemişken, NGS analizi yapılan 49 olgunun 6 (%12,4)'sında patojenik, 2 (%4,1)'si klinik önemi belirsiz olmak üzere toplam 8 (%16,3) adet olguda klinikleri ile ilişkili olabilecek *PRSSI* varyantı tespit edilmiştir. Patojenik varyant taşıyan 6 olgudan 4'ünün tanısı kronik pankreatit, 2'sininki rekürren akut pankreatitken; klinik önemi belirsiz varyantları taşıyan 2 olgunun tanıları akut pankreatit ve rekürren akut pankreatittir. Diğer çalışmalarda genellikle %0-10 aralığında *PRSSI* varyasyonları saptandığı göz önüne alındığında; hasta grubumuzda %16,3 oranında *PRSSI* varyasyonları bulunması ile tanı oranımızın kısmen daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca patojenik *PRSSI* varyantlarının dağılımına bakıldığında, literatürde en sık olarak saptanan varyantın p.R122H (~%65-70) olduğu bildirilmiş, bizim çalışmamızda da patojenik varyantların 4 (%66,7)'ü p.R122H olarak bulunmuştur (45, 47, 58).

5.1.2. *SPINK1* Varyantlarının Değerlendirilmesi

SPINK1 geni dizi varyantları ile ilgili en yüksek oran ise %56,2 ile Liu ve arkadaşlarının idiyopatik kronik pankreatit çalışmasında bildirilmişken, akut ve rekürren akut pankreatit gruplarında *SPINK1* varyantlarına rastlanmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur (205, 269, 272). *SPINK1* geni kopya sayısı değişimlerini araştıran geniş çaplı araştırmaların hiçbirinde de CNV'ler tespit edilmemiştir (Tablo 5.1.) (144, 246). Çalışmamızda vakalarımızın 1 (%2,1)'inde patojenik, 1 (%2,1)'inde olası patojenik, 1 (%2,1)'inde klinik önemi belirsiz olmak üzere %6,4 oranında *SPINK1* varyantı taşıyan olgu saptanırken, hiçbir vakamızda kopya sayısı değişimi tespit edilmedi. Kendi vakalarımızdaki %6,4'lük *SPINK1* varyasyonu oranı, %40'ın üzerinde oran bildiren Asya toplumlarından oldukça düşükken; Amerikan, Leh ve İtalyan merkezlerin oranlarıyla daha benzer idi. (76, 205, 208, 211, 271-273).

Özellikle Batı toplumlarında *SPINK1* geni p.N34S varyantının genel popülasyonun dahi %1-3'ünde bulunan sık bir varyant olduğu bildirilmişse de, bizim vaka grubumuzda bu varyanta rastlanmadı (39). Bununla beraber, daha önce literatürde ve sağlıklı toplum veritabanlarında hiç bildirilmemiş yeni bir varyant olan c.162delT (p.N56Mfs*39) 33 numaralı kronik pankreatit hastamızda tespit edildi. Yine literatürde daha önce hiç pankreatitle ilişkilendirilmemiş ve toplum veritabanlarından sadece GME Variome'da 1985 allelin 1'inde tespit edilmiş olan c.181T>C (p.C61R) varyantı 29 nolu rekürren akut pankreatit olgumuzda bulunmuş; ve pankreatit kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

5.1.3. *CTRC* Varyantlarının Değerlendirilmesi:

Literatürde *CTRC* geninin dizi varyantları ile ilgili yapılan çalışmalarda %8,8 ile en yüksek tanı oranı Grabarczyk ve arkadaşlarının çalışmasında bildirilmişken; çoğu çalışmada *CTRC* varyantlarına az sıklıkta rastlanmış veya hiç tespit edilmemişlerdir (246, 247, 269, 271, 273). Ayrıca *CTRC* geninin kopya sayısı değişimlerinin araştırıldığı tek çalışmada 253 kronik pankreatit vakasının hiçbirinde kopya sayısı değişimlerine rastlanmamıştır (Tablo 5.1.) (144). *CTRC* dizi analizi ile 47 olgumuzun 2 (%4,2)'sinde heterozigot, 1 (%2,1)'inde homozigot konumda olmak

üzere 3 (%6,4) olguda patojenik c.703G>A varyantı tespit edilirken, bu gene ait kopya sayısı değişimleri bizim örneklemimizde de bulunmadı. Olgularımızda saptadığımız %6,4'lük *CFTR* varyasyonu oranı literatür verileriyle uyumlu olarak görüldü.

5.1.4. *CFTR* Varyantlarının Değerlendirilmesi:

Literatürde bildirilen *CFTR* geni dizi varyantlarının oranı yayınlar arasında varyant değerlendirme farklılığına bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir. En yüksek anomali oranı %61,9 ile Garg ve arkadaşları tarafından bildirilmişken, araştırmacılar sık gözlenen polimorfizmleri de yayına dahil etmişlerdir (76). Yine %50 gibi yüksek bir oran bildiren Pelletier ve arkadaşları da oranlarına IVS8-5T varyantını dahil etmişlerdir. *CFTR* geninin kopya sayısı değişimlerinin incelendiği çalışmalarda sadece Sofia ve arkadaşları 80 idiyopatik kronik pankreatit vakalarının 1 (%1,3)'inde anomali tespit etmiş olup, diğer çalışmalarda CNV'ler saptanmamıştır (Tablo 5.1.) (144, 163, 274). Bizim çalışmamızda ise 1 (%2) olguda patojenik, 4 (%8,2) olguda olası patojenik, 4 (%8,2) olguda klinik önemi belirsiz olmak üzere 9 (%18,7) olguda *CFTR* geni dizi varyantları saptanırken; hiçbir olguda kopya sayısı değişimine rastlanmadı. Tespit ettiğimiz *CFTR* geni varyantlarının oranı genel olarak literatürle korele olarak gözlemlendi.

Vaka grubumuzda bulunan olguların hiçbirinde literatürle de uyumlu olarak ağır kistik fibrozis fenotipiyle ilişkilendirilmiş p.F508del gibi varyantlara rastlanmazken; genellikle klasik kistik fibrozis için penetransı tam olmayan hafif varyantlara veya klinik önemi bilinmeyen yeni varyantlara rastlandı (33). 19 nolu kronik pankreatit olgusunda *CFTR* genindeki heterozigot c.703G>A varyantına eşlik ettiği tespit edilen *CFTR* geninin c.2605A>G (p.I869V) varyantı ve yine 31 nolu rekürren akut pankreatit vakamızda tespit edilen c.869+2T>C varyantı daha önce literatürde ve sağlıklı toplum veritabanlarında bildirilmemiş ve ilk kez bizim çalışmamızla tespit edilmiştir.

5.1.5. Kompleks Genetik Etiyolojinin Değerlendirilmesi

Pankreatit kompleks bir genetik hastalık olup yapılan çalışmalarda sıklıkla hastaların belli bir oranında birden fazla geni ilgilendiren varyasyonlara rastlanmaktadır (139). Masson ve arkadaşları idiyopatik kronik pankreatitli olgularının 22 (%8,7) 'sinde, Rosendahl ve arkadaşları ise 43/660 (%6,5) kronik pankreatitli vakalarında birden fazla gende patojenik değişimler saptamıştır (144, 145). Bizim çalışmamızda da bu verilerle uyumlu olarak, tüm analizlerin planlanabildiği 16 kronik pankreatitli olgunun 1 (%6,3) 'inde iki geni etkileyen varyantlar tespit edilmişken, tüm tanı gruplarında 4 (%8,9) vakada farklı genleri ilgilendiren varyasyonlar tespit edildi.

Pankreatitin kompleks genetiği ile ilgili olarak literatürde özellikle *CFTR* ve *SPINK1* varyantlarının bir arada bulunmasının rekürren akut pankreatit ve kronik pankreatit gelişim riskini belirgin artırdığından ve bu iki genin varyantlarının birbirlerine sinerjistik etkide bulduklarından bahsedilmektedir (126, 153). Bizim vaka grubumuzda ise *CTRC* ve *CFTR* varyantlarının birlikteliğinin olgularımızda en sık (%4,4) saptanan kompleks genetik anomali olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra, *CTRC* geninde patojenik varyant taşıyan 3 olgumuzun 2 (%66,7)'sinde eşlik eden *CFTR* varyasyonu olduğu belirlendi. *SPINK1* ve *CFTR* varyantlarını birlikte taşıyan sadece 1 olgu (%2,2) tespit edilmişken; yine *SPINK1* varyantı taşıyan 3 olgumuzun 1 (%33,3)'inde *CFTR* varyantı birlikteliği saptandı.

Kompleks genetik etiyoloji saptanan vaka oranımız literatürle korele olmasına rağmen, vaka sayımızın az olması spesifik gen-gen etkileşimleri hakkında yorumda bulunmamızı mümkün kılmamaktadır. Ancak yine de çalışma sonuçlarımızın, olası metaanalizlerde başka merkezlerin sonuçlarıyla birleştirilerek pankreatit patogenezinde gen-gen etkileşimleri konusunun aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

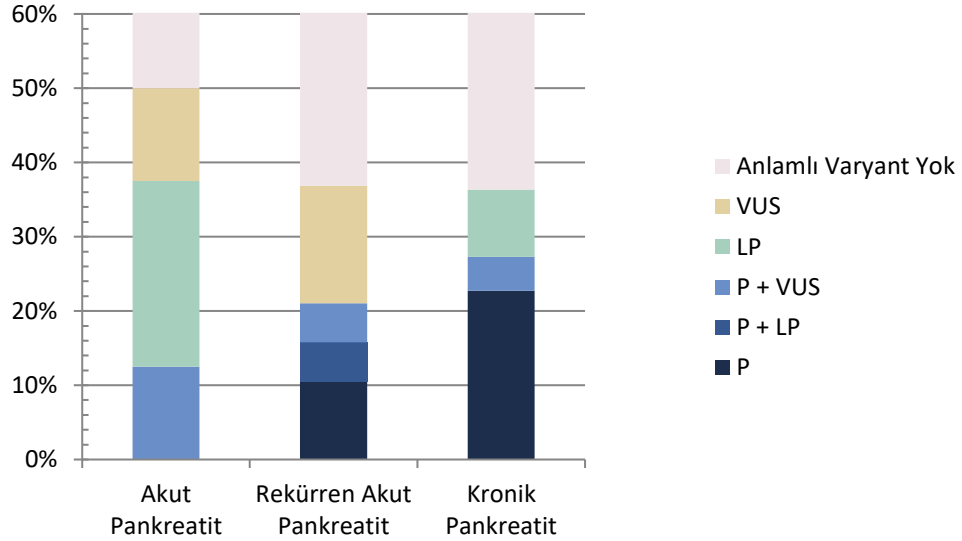
Tablo 5.1. Pankreatit olgularında genetik incelemeler yapılan çalışmalar ve ilgili genetik varyasyonların saptandığı olgu sayısı ile oranları

Tanı Grubu	Yaş Grubu	PRSSI SNV	SPINK1 SNV	CTRC SNV	CFTR SNV	PRSSI CNV	SPINK1 CNV	CTRC CNV	CFTR CNV	CTRC c.180C>T	CFTR p.V470M	CFTR IVS8-5T	Kaynak
KP	19-86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/47 (%8,5)	Kimura vd., 2000 (266)
ARP	6-24	1/40 (%2,5)	6/40 (%15)	-	1/40 (%2,5)	-	-	-	-	-	-	0/40 (%0,0)	Tomaszewska vd., 2006 (275)
KP	5-24	11/52 (%21,2)	8/52 (%15,4)	-	4/52 (%7,7)	-	-	-	-	-	-	4/52 (%7,7)	Tomaszewska vd., 2006 (275)
KP + RAP	-	36/381 (%9,4)	60/381 (%15,7)	-	111/381 (%29,1)	-	-	-	-	-	-	46/381 (%12,1)	Keiles vd., 2006 (276)
İKP	\bar{x} : 45	-	-	-	16/78 (%20,5)	-	-	-	-	-	72/156 (%46,2)	6/78 (%7,6)	Chang vd., 2007 (267)
İRAP + İKP	-	0/56 (%0,0)	23/56 (%41,1)	-	26/42 (%61,9)	-	-	-	-	-	-	0/42 (%0,0)	Garg vd., 2009 (76)
İP	9-53	2/40 (%5,0)	11/40 (%27,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Oh vd., 2009 (277)
İRAP + İKP	-	-	-	-	50/100 (%50)	-	-	-	-	-	-	20/100 (%20)	Pelletier vd., 2010 (278)
İKP	<30	18/122 (%8,1)	25/122 (%20,5)	-	9/122 (%7,4)	-	-	-	-	-	-	5/122 (%4,1)	Joergensen vd., 2010 (279)
RAP	<14	2/44 (%4,5)	3/42 (%7,1)	-	20/53 (%37,7)	-	-	-	-	-	-	5/53 (%9,4)	Lucidi vd., 2011 (208)
RAP + KP	<18	4/32 (%12,5)	11/32 (%34,4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lee vd., 2011 (204)
İRAP + İKP	3-70	11/351 (%3,1)	17/351 (%4,8)	-	35/351 (%10)	-	-	-	0/351 (%0,0)	-	-	6/351 (%1,7)	Hamoir vd., 2013 (274)
İKP	3-18	7/75 (%9,3)	43/75 (%57,3)	0/75 (%0,0)	1/75 (%1,3)	1/75 (%1,3)	-	-	-	-	-	5/75 (%6,7)	Wang vd., 2013 (271)
İKP	\leq 20	10/253 (%4,0)	40/253 (%15,8)	11/253 (%4,3)	55/253 (%21,7)	13/253 (%5,1)	0/253 (%0,0)	0/253 (%0,0)	0/253 (%0,0)	-	-	19/253 (%7,5)	Masson vd., 2013 (144)

Tanı Grubu	Yaş Grubu	PRSSI SNV	SPINK1 SNV	CTRC SNV	CFTR SNV	PRSSI CNV	SPINK1 CNV	CTRC CNV	CFTR CNV	CTRC c.180C>T	CFTR p.V470M	CFTR - IVS8-5T	Kaynak
İKP	1-81	55/660 (%8,3)	129/660 (%19,5)	22/546 (%4,0)	103/660 (%15,6)	-	-	-	-	-	607/1320 (%46)	40/660 (%6,0)	Rosendahl vd., 2013 (145)
AP	-	-	-	-	19/211 (%9,0)	-	-	-	-	-	-	11/211 (%5,2)	Ariga vd., 2013 (280)
KP	-	9/170 (%5,3)	36/271 (%13,3)	-	33/271 (%12,2)	-	-	-	-	-	-	10/271 (%3,7)	Ariga vd., 2013 (280)
İAP	̄x: 55.4	-	4/63 (%6,3)	0/63 (%0,0)	0/63 (%0,0)	-	-	-	-	-	-	-	Koziel vd., 2015 (273)
İP	1-88	11/116 (%9,5)	16/116 (%13,8)	1/116 (%0,9)	8/116 (%6,9)	0/93 (%0,0)	0/93 (%0,0)	-	-	-	-	-	Cho vd., 2016 (246)
İKP	3-61	6/80 (%7,5)	2/80 (%2,5)	3/80 (%3,8)	31/80 (%38,8)	-	-	-	1/80 (%1,3)	-	-	-	Sofia vd., 2016 (163)
RAP	>18	0/45 (%0,0)	0/45 (%0,0)	0/45 (%0,0)	5/45 (%11,1)	-	-	-	-	-	-	-	Evans vd., 2016 (269)
KP	>18	1/230 (%0,04)	4/230 (%1,7)	0/230 (%0,0)	13/230 (%5,7)	-	-	-	-	-	-	-	Evans vd., 2016 (269)
İRAP + İKP	<18	7/69 (%10,1)	5/69 (%7,2)	-	23/69 (%33,3)	-	-	-	-	-	-	-	Vue vd., 2016 (211)
İKP	<18	34/276 (%12,3)	66/276 (%23,9)	-	20/276 (%7,2)	-	-	-	-	-	-	-	Wejnarska vd., 2016 (207)
RAP + KP	<18	2/44 (%4,5)	11/44 (%25)	2/27 (%7,4)	17/45 (37,8)	-	-	-	-	-	-	-	Palermo vd., 2016 (210)
İAP	>18	4/59 (%6,8)	21/59 (%35,6)	2/59 (%3,4)	22/59 (%37,3)	-	-	-	-	-	-	7/59 (%11,9)	Jalaly vd., 2017 (52)
İRAP	>18	5/97 (%5,2)	22/97 (%22,7)	2/97 (%2,1)	40/97 (%41,2)	-	-	-	-	-	-	13/97 (%13,4)	Jalaly vd., 2017 (52)
İKP	>18	0/26 (%0,0)	2/26 (%7,7)	0/26 (%0,0)	5/26 (%19,2)	-	-	-	-	-	-	1/26 (%3,8)	Jalaly vd., 2017 (52)

Tanı Grubu	Yaş Grubu	PRSSI SNV	SPINK1 SNV	CTRC SNV	CFTR SNV	PRSSI CNV	SPINK1 CNV	CTRC CNV	CFTR CNV	CTRC c.180C>T	CFTR p.V470M	CFTR - IVS8-5T	Kaynak
İRAP	<18	3/14 (%21,4)	1/14 (%7,1)	0/55 (%0,0)	3/14 (%21,4)	-	-	-	-	-	-	-	Xiao vd., 2017 (281)
İKİP	<18	14/55 (%25,4)	16/55 (%29,1)	1/55 (%1,8)	14/55 (%25,5)	-	-	-	-	-	-	-	Xiao vd., 2017 (281)
RAP + KP	<19	75/240 (%31,3)	40/215 (%18,6)	10/150 (%6,7)	72/236 (%30,5)	-	-	-	-	-	-	3/236 (%1,3)	Giefer vd., 2017 (241)
İKİP	<14	14/73 (%19,2)	41/73 (%56,2)	-	2/73 (%2,7)	-	-	-	-	-	-	-	Liu vd., 2017 (205)
İKİP	<18	11/136 (%8,1)	25/136 (%18,4)	12/136 (%8,8)	10/136 (%7,3)	-	-	-	-	87/232 (%37,5)	-	-	Grabarczyk vd., 2017 (247)
İKİP	10-14	0/40 (%0,0)	19/40 (%47,5)	-	0/40 (%0,0)	-	-	-	-	-	-	4/40 (%10)	Poddar vd., 2017 (270)
İKİP	6-85	98/715 (%13,7)	317/715 (%44,3)	22/715 (%3,1)	50/715 (%7,0)	-	-	-	-	16/1430 (%1,1)	-	-	Zou vd., 2018 (122)
AP	<18	1/54 (%1,9)	0/54 (%0,0)	1/54 (%1,9)	6/54 (%11,1)	-	-	-	-	-	-	-	Abu-El-Haija vd., 2019 (272)
RAP	<18	0/31 (%0,0)	0/31 (%0,0)	0/31 (%0,0)	1/31 (%3,2)	-	-	-	-	-	-	-	Abu-El-Haija vd., 2019 (272)
KP	<18	3/26 (%11,5)	4/26 (%15,4)	0/26 (%0,0)	5/26 (%19,2)	-	-	-	-	-	-	-	Abu-El-Haija vd., 2019 (272)
İRAP + İKİP	<19	100/333 (%30)	61/307 (%19,9)	15/210 (%7,1)	102/331 (%30,8)	-	-	-	-	-	-	-	Dike vd., 2020 (203)
İAP	5-70	1/8 (%12,5)	0/8 (%0,0)	1/8 (%12,5)	3/8 (%37,5)	0/8 (%0,0)	0/8 (%0,0)	0/8 (%0,0)	0/8 (%0,0)	1/8 (%12,5)	4/8 (%50)	0/8 (%0,0)	Mevcut çalışma
İRAP	5-56	3/19 (%15,8)	2/19 (%10,5)	0/19 (%0,0)	4/19 (%21,1)	0/19 (%0,0)	0/19 (%0,0)	0/19 (%0,0)	0/19 (%0,0)	3/19 (%15,8)	10/19 (%52,6)	2/19 (%10,5)	Mevcut çalışma
İKİP	12-67	4/22 (%18,2)	1/20 (%5,0)	2/20 (%10,0)	2/22 (%9,1)	0/20 (%0,0)	0/20 (%0,0)	0/20 (%0,0)	0/20 (%0,0)	6/20 (%30)	11/22 (%50)	1/22 (%4,5)	Mevcut çalışma
İ: İdiyopatik, AP: Akut pankreatit, RAP: Rekürren akut pankreatit, KP: Kronik pankreatit, SNV: Tek nükleotit varyantı, CNV: Kopya sayısı varyantı													

5.1.6. Tanı Gruplarına Göre Varyantlarının Değerlendirilmesi



Şekil 5.1. Klinik tanı gruplarına göre olgularda saptanan varyasyonların oranlarının karşılaştırılması

Vakalarımızı tanı alt gruplarına göre değerlendirdiğimizde akut pankreatitli 8 hastamızın 1 (%12,5)'inde patojenik ve klinik önemi belirsiz varyant birlikteliği, 2 (%25)'sinde olası patojenik varyant ve 1 (%12,5)'inde klinik önemi belirsiz varyant olmak üzere 4 (%50) vakada olguların kliniği ile ilişkili olabilecek varyantlar tespit edildi. Rekürren akut pankreatitli 19 vakamızdan ise 2 (%10,5)'sinde izole patojenik, 1 (%5,3)'inde patojenik ve olası patojenik varyant birlikteliği, 1 (%5,3)'inde patojenik ve klinik önemi belirsiz varyant birlikteliği ile 3 (%15,8)'ünde de klinik önemi belirsiz varyant olmak üzere 7 (%36,8)'sinde klinikle ilişkili olabilecek varyantlar tespit edildi. Kronik pankreatitli 22 vakamızın 5 (%22,7)'inde izole patojenik, 1 (%4,5)'inde patojenik ve olası patojenik varyant birlikteliği, 2 (%9,1)'sinde olası patojenik varyantlar olmak üzere 8 (%36,6)'inde klinikle ilişkili olabilecek varyantlar bulundu (Şekil 5.1.). Çalışmamızda her ne kadar tanı oranı en yüksek grup akut pankreatit olarak görünse de, kısıtlı vaka sayısı böyle bir çıkarımda bulunmayı zorlaştırmakta; patojenitesi kesin bilinen varyasyonların en sık bulunduğu tanı grubunun kronik pankreatitler (%27,3) olması da dikkat çekmektedir.

5.1.7. Toplumda Yaygın Gözlenen Varyantların Değerlendirilmesi

Toplumda yaygın gözlenen varyantlarla ilgili olarak; pankreatit ile *CFTR* geninin IVS8-5T varyantı arasındaki ilişki hakkında literatürde çelişkili veriler bulunmaktadır. Küçük hasta gruplarında yapılan görece eski çalışmalar anlamlı bir ilişki olduğunu savunurken, Rosendahl'ın 2013 yılındaki 660 kronik pankreatit olgusu ve 1758 kontrolü karşılaştırdıkları geniş kapsamlı çalışmasında 5T alleli ile idiyopatik kronik pankreatit riski açısından istatistiksel anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (139, 145). Yakın zamanda yapılan bir metaanalizde ise 5T allelinin kronik pankreatit riskini özellikle Avrupa orijinli toplumlarda belirgin olarak artırdığı bildirilmiştir (282). Bizim çalışmamızda 5T alleli idiyopatik pankreatit vakalarında kontrollere oranla daha yüksek sıklıkta bulunmuş olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı ilişki kurulamamıştır ($p=0,118$). Tek başına kronik pankreatit tanı grubu değerlendirildiğinde de 5T allel frekansı $1/44$ (%2,3) olarak kontrol grubundan yüksek bulunmakta, ancak yine de risk artışı istatistiksel olarak kanıtlanamamaktadır ($p=0,344$).

CFTR geni p.V470M varyantı toplumda oldukça yüksek sıklıkta bulunan (gnomAD MAF: %48,65) bir varyant olmakla birlikte, 2020 yılında yayınlanan güncel bir makale, *CFTR* proteinin 470. pozisyonda metiyonin kodlanmasına yol açan allelinin pankreatit için anlamlı bir risk artışına yol açtığını savunmaktaydı (146). Yaptığımız çalışmada pankreatit hastalarımızda c.1408G>A varyantının allel frekansı kontrol grubumuzdan oldukça düşük olarak tespit edilmiş (%30,6 ve %38,4) ve sonuçlarımızın bu metaanalizi desteklemediği görülmüştür.

CTRC geni c.180C>T (p.G60G) varyantı sessiz bir varyant olup protein dizisinde herhangi bir bozulmaya yol açmamasına rağmen; güncel yayınlarda pankreatit olgularında kontrollere göre daha yüksek sıklıkta bulunmuş ve varyantın pankreatit gelişim riskinde etkili olabileceği bildirilmiştir (131, 247). Çalışmamızda pankreatit vakalarında allel frekansı %12,8 ve kontrollerdeki allel frekansı %9,4 olarak tespit edilen bu varyantın da pankreatit riskiyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkili kurulamamış ($p=0,353$) ve geçmiş yayınların bu savı çalışmamızla desteklenememiştir.

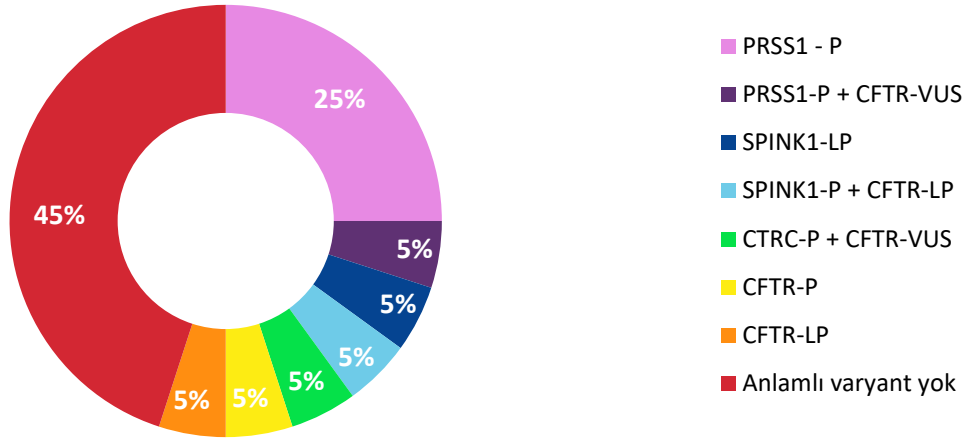
5.2. Genetik Varyasyonlarla Klinik Bulguların İlişkisinin Değerlendirilmesi

5.2.1. İlk Atak Başlangıç Yaşı ve Genetik Varyasyonların İlişkisi

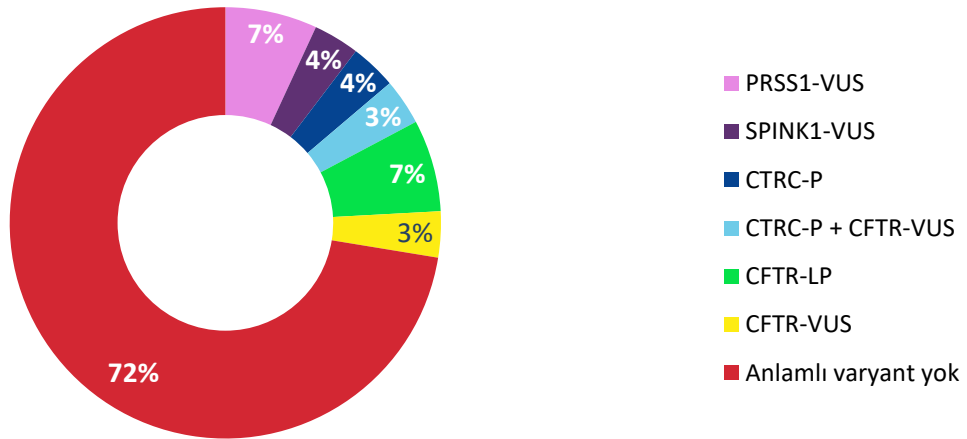
Pankreatitle ilişkili semptomları ilk olarak 18 yaş öncesinde başlayan 20 olgunun 6 (%30)'sında *PRSSI*, 2 (%10)'sinde *SPINK1*, 1 (%5)'inde *CTRC* ve 5 (%25)'inde *CFTR* varyasyonları saptanmıştır. Birer olguda *PRSSI*, *SPINK1* ve *CTRC* varyantına eşlik eden *CFTR* varyantı olduğu görülmüş ve 3 (%15) vakada multipl genetik etiyoloji olduğu belirlenmiştir. Böylece bulguları 18 yaş öncesinde başlayan olgu grubumuzun %55'inde genetik etiyoloji olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.2.).

Semptomları 18 yaş ve sonrasında başlayan 29 olgunun ise 2 (%6,9)'sinde *PRSSI*, 1 (%3,4)'inde *SPINK1*, 2 (%6,9)'inde *CTRC* ve 4 (%13,8)'ünde *CFTR* varyasyonları bulunduğu belirlendi. Ayrıca *CTRC* varyantı bulunduran 1 vakada eşlik eden *CFTR* varyantı da bulunup; 1 (%3,4) vakada multipl olmak üzere; 18 yaş sonrası semptomatik olan hastaların %27,6'sında genetik etiyoloji olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.3.).

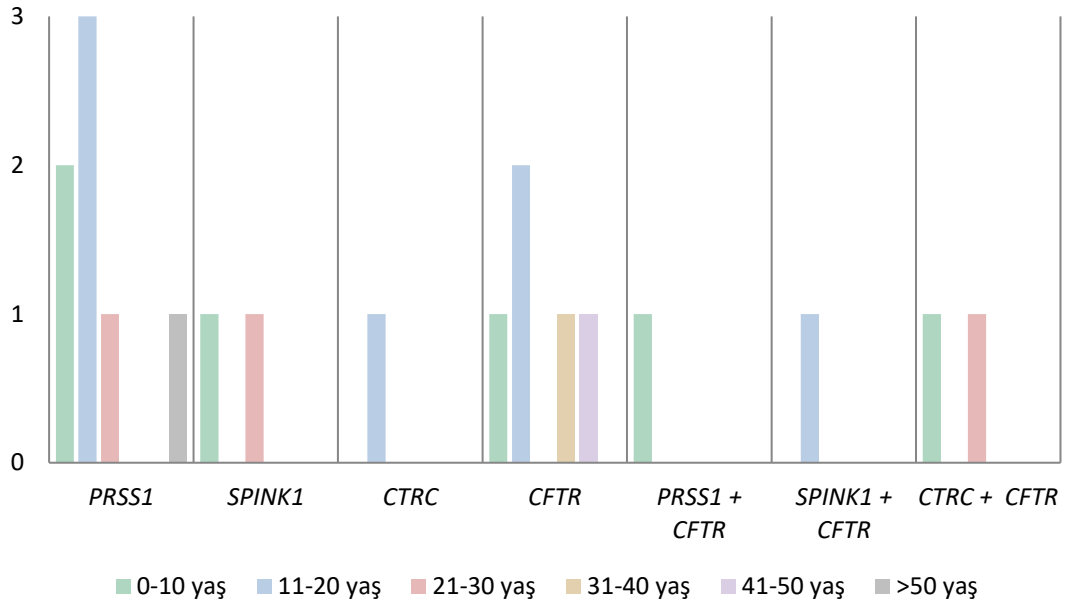
Semptomları 18 yaş öncesinde başlayan grupta genetik varyant oranı yaklaşık 2 kat, kompleks genetik etiyoloji saptanma oranının ise 4,4 kat daha yüksek olduğu görüldü. Bütün genler tek tek değerlendirildiğinde de sadece *CTRC* varyantlarının 18 yaş ve sonrasında semptomatik olan grupta daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak *CTRC* ve *SPINK1* varyantları saptanan olguların sayısının oldukça kısıtlı olması nedeniyle bu ilişkinin araştırılması için daha fazla olgu grubuna ihtiyaç duyulduğu düşünüldü. *PRSSI* varyantları ise atakları pediatrik dönemde başlayan grupta 4,3 kat daha sık gözlemlendi. Üstelik *PRSSI* geninin bilinen patojenik varyantlarını taşıyan bütün olgularda atakların 18 yaş öncesinde saptandığı görüldü. Yine diğer genlerden *SPINK1* ve *CFTR*'nin patojenik varyantlarını taşıyan olgularda semptomlar pediatrik dönemde başlamışken, *CTRC* geninin patojenik c.703G>A dönüşümünü homozigot bulunduran vakamızda semptomların pediatrik dönemde, heterozigot bulunduranlarda erişkin dönemde başladığı görüldü (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5.).



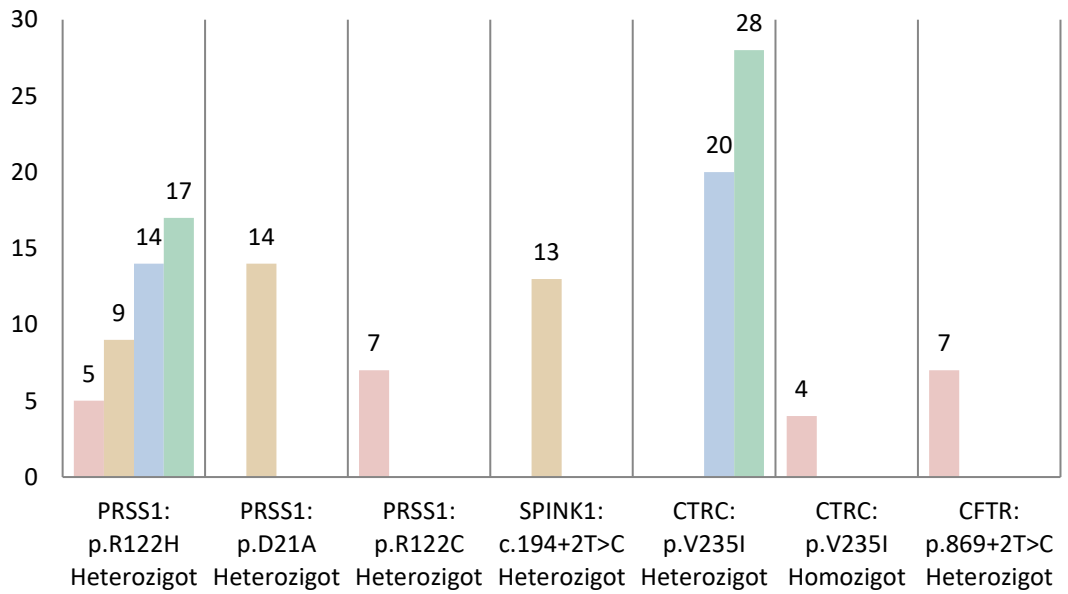
Şekil 5.2. 18 yaş öncesinde semptomları başlayan 20 olguda saptanan genetik varyasyonların dağılımı



Şekil 5.3. Semptomları 18 yaş sonrasında başlayan 29 olguda saptanan genetik varyasyonların dağılımı

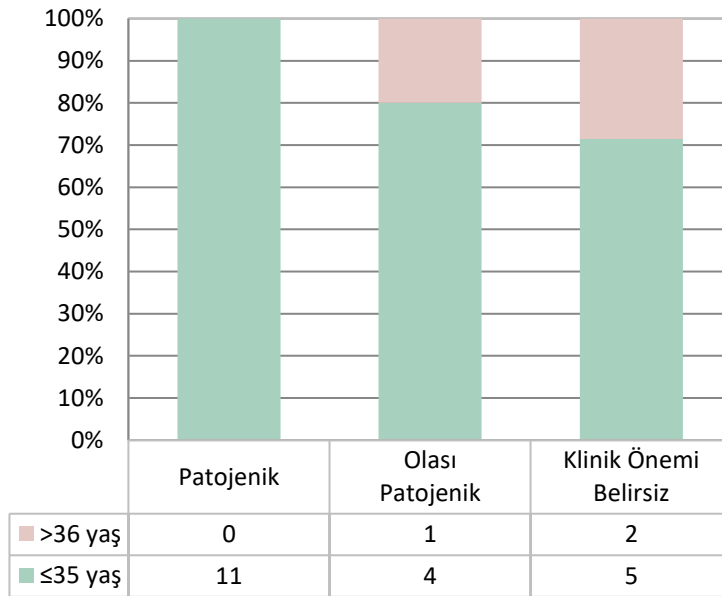


Şekil 5.4. Genetik değişim saptanan olgularda, ilgili genlerde semptom başlangıç yaşlarına göre olgu sayılarının dağılımı



Şekil 5.5. Patojenik varyant taşıyan olgulardaki varyanta göre ilk atak başlangıç yaşları

Güncel literatürde özellikle ilk atağını 35 yaş öncesinde geçirmiş kronik pankreatitli olgularda genetik test planlanması önerilmektedir (71). Bizim çalışmamızda da patojenitesi kesin bilinen varyantların tümüne ilk atağını 35 yaş ve öncesinde geçiren olgularda rastlanmışken (Şekil 5.6.); semptomları 35 yaş sonrasında başlamış 12 olgunun 1 (%8,3)'inde olası patojenik değişim, 2 (%16,7)'sinde de klinik önemi bilinmeyen değişim saptanmıştır. Bu örnekler her ne kadar daha az sıklıkla saptanmış olsa da, semptomları 35 yaş sonrasında başlayan vakalarda da genetik incelemelerin tanı algoritmasında yerinin olduğunu göstermektedir.

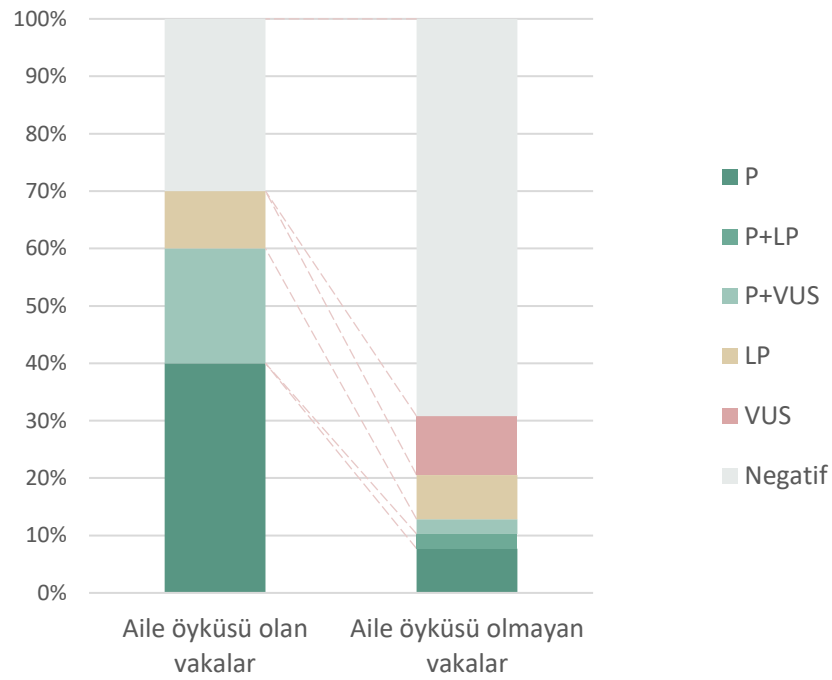


Şekil 5.6. Saptanan varyantların ilk atağını 35 yaş öncesi veya sonrasında geçiren olgulara göre dağılımı

5.2.2. Aile Öyküsü ve Genetik Varyasyonların İlişkisinin Değerlendirilmesi

Moleküler analizler sonucunda aile öyküsü olan 10 olgunun 7 (%70)'sinde *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* veya *CFTR* genlerini ilgilendiren patojenik değişimlere rastlandı (Şekil 5.7.). Aile öyküsü pozitif olan vakalarda en sık *PRSSI* (4/10, %40) varyantları tespit edilirken, bunu *CFTR* (3/10, %30) ile *CTRC* (2/10, %20) varyantları takip etti. Aile öyküsü olmayan 39 olgunun ise 12 (%30,7)'sinde klinik anlamlı olabilecek değişimler saptanmıştır. Bu durum da idiyopatik pankreatit olgularında aile

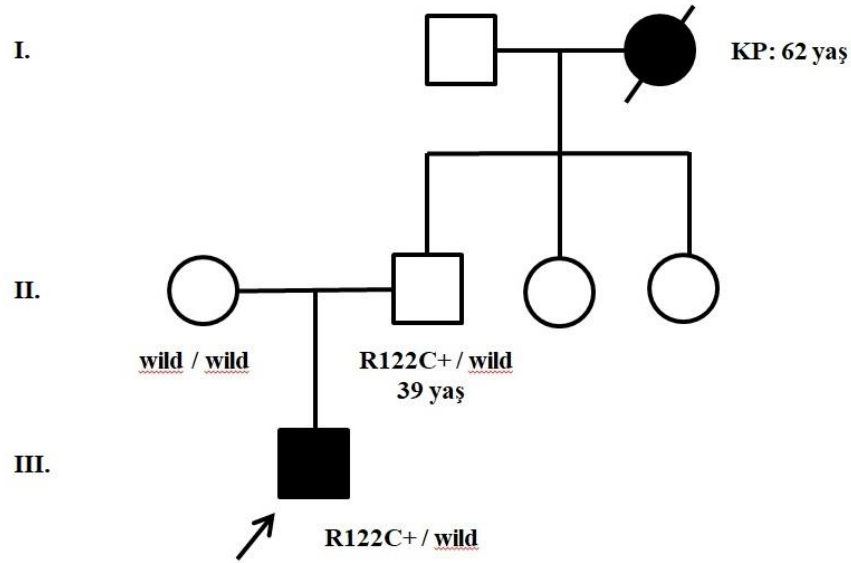
öyküsü olmayan vakalardan da genetik inceleme yapma endikasyonunun bulunduğunu göstermektedir. Aile öyküsü ailevi pankreatitlerle uyumlu olan 3 vakamızda incelediğimiz genlerde herhangi bir genetik varyanta rastlanmaması ise, pankreatit hastalarında incelenen genlerin *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* ile sınırlı kalmadığını ve güncel yayınlarda bulunan diğer genler açısından da inceleme yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 5.7. Aile öyküsü olan vakalar ile aile öyküsü olmayan vakalarda saptanan varyant oranlarının karşılaştırılması

PRSSI patojenik varyantları tespit ettiğimiz 6 olgunun 4'ünde aile öyküsünün pozitif olduğu belirlendi. c.365G>A (p.R122H) patojenik varyantını taşıyan 4 olgunun 2'sinin aile öyküsü pozitifken, 2 olgunun ailesinde pankreatit öyküsü alınmadı. Literatürde p.R122H varyantını taşıyan ailelerde penetransın yaklaşık %80, p.R122C varyantında ise yaklaşık %40-50 olduğu bildirilmektedir (44, 191, 192). Tespit ettiğimiz aile öyküsü negatif p.R122H olgularının ebeveynlerinden segregasyon analizi gerçekleştirilemediği için; bu durumun saptanan varyantın tam penetran olmamasına mı yoksa *de novo* kalıtılmış olmasına mı bağlı olduğu belirlenemedi. Bu

varyantı taşıyıp aile öyküsü negatif olan 24 numaralı olgunun çocuklarına yapılabilen segregasyon analizinde 12 yaşındaki asemptomatik oğlunun ilgili varyant açısından taşıyıcı olduğu fark edilse de, vakanın yaşının çok küçük olması sebebiyle penetrans değerlendirilmesi yapılmadı. Ancak bulgular kısmında da bahsettiğimiz ve moleküler genetik incelemeler sonucunda p.R122H varyantını taşıdığı tespit edilen 4 numaralı olgunun pedigrisi analizi varyantın tam penetran olmadığına kendi vakalarımızdan bir örnek olmaktadır (Şekil 4.6.). p.R122C varyantını heterozigot olarak bulunduran tek olgunun babaannesinin 7 yaşından itibaren semptomatik olup 62 yaşında kronik pankreatit tanısını aldığı öğrenildi. Olgunun 39 yaşındaki asemptomatik babasında planlanan *PRSS1* geni dizi analizinde, babanın da bu varyant açısından heterozigot olduğu tespit edilmesi varyantın eksik/yaşa bağlı penetrans gösterdiğine yeni bir örnek oldu (Şekil 5.8.).



Şekil 5.8. 41 nolu olgunun pedigrisi analizi gösterilmiştir. İçi dolu kutucuklar hastalığı fenotipinde gösteren olguları tanımlamaktadır.

SPINK1 varyantları tespit edilen 3 olgunun da aile öyküsü negatifken; *CTRC* geni c.703G>A varyantı tespit ettiğimiz 3 olgunun 2'sinin ailesinde pankreatit öyküsü olduğu belirlendi. Segregasyon analizlerinde varyantı homozigot durumda bulunduran vakamızın 35 yaşındaki asemptomatik anne ve babası aynı varyant için heterozigot

olarak tespit edildi. Yine bulgular kısmında pedigrî örneğini verdiğimiz (Şekil 4.7.) ve *CTRC* geninde c.703G>A varyantını taşıdığı tespit edilen 22 nolu olgunun ise pankreatit tanılı 51 yaşındaki erkek kardeşinde ve 41 yaşındaki asemptomatik kız kardeşinde bu değişim saptandı. Segregasyon analizleri sonucunda *CTRC* geninin c.703G>A varyantının 35 yaşındaki penetransının heterozigot konumdayken 3/6 (%50) olduğu tespit edildi.

İzole *CFTR* varyantı taşıyan 5 vakamızın sadece c.2991G>C varyantını taşıyan 37 numaralı olgunun annesinde de rekürren akut pankreatit tanısının bulunduğu öğrenildi, ancak ailede segregasyon analizi uygulanamadı. Aynı varyantı taşıyan 25 nolu olgunun ailesinde planlanan segregasyon analizinde 49. yaşındaki asemptomatik babasında aynı varyantın heterozigot olarak bulunduğu tespit edildi. *CFTR* varyantlarının pankreatit için oldukça düşük penetran etki gösterdiği bilinse de, bu varyantı taşıyan sınırlı sayıda vakaya sahip olduğumuz için penetrans değerlendirmesi yapılmadı (139).

5.2.3. Genetik Varyasyonlar ve Klinik Progresyon Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Kronik pankreatitli hastalarda *PRSSI* dışı genlerde patojenik varyant saptanan olgu sayısının kısıtlı olması, varyantların klinik progresyona etkisini değerlendirmeyi mümkün kılmadı. *PRSSI* patojenik varyantı taşıyan kronik pankreatitli 4 olguda ise kliniğin ağırlığı ile ilişkilendirilen kronik ağrı ve ekzokrin fonksiyonlarda bozulma genetik varyant saptanmayan gruptan daha az oranda görülmüşken, endokrin fonksiyonlarda bozulmanın *PRSSI* mutant kronik pankreatitli vakalarda daha sık saptanmıştır. Ancak gerek hasta sayımızın oldukça kısıtlı olması; gerekse de *PRSSI* varyantı taşıyan ve genetik varyant saptanmayan kronik pankreatitli olguların yaş ortalaması (sırasıyla 24,5 ve 36,1) arasında büyük fark olması sebebiyle bu değerler arasında karşılaştırma yapılmamış ve genotip-fenotip ilişkilerinin kurulması için daha kapsamlı vaka sayısında, daha detaylı ve uzun süreli çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.

5.2.4. Genetik Varyasyonlar ve Pankreatik Divisum Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Pankreatik divisum ve pankreatit riski arasında çelişkili veriler bildirilmiştir. Pankreatitin ek risk faktörü olmayan pankreatik divisumlu olgularda daha yüksek oranda gözlenmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (74, 283). Bununla beraber daha güncel çalışmalar pankreatik divisumun çocuklarda genetik faktörlerden bağımsız olarak başlı başına riske yol açabileceğini de ortaya koymaktadır (72). Bizim çalışmamızda da hem tüm idiyopatik pankreatit grubumuzda (8/45, %17,8), hem de herhangi bir genetik varyant tespit edilmeyen (6/28, %21,4) hastalarımızda pankreatik divisum oranı normal popülasyon için bildirilen orandan (%4-10) daha yüksek oranda bulunmuş, ancak kendi toplumuz içinden bir kontrol grubuyla karşılaştırma yapmadığımız için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır (16, 17).

Geçmiş yayınlarda ayrıca pankreatik divisumun tek başına pankreatit için risk yaratmadığı, ancak özellikle *CFTR* geninin patojenik değişimleri ile bir arada bulunduğu pankreatit riskini artırdığı hipotezi ortaya atılmıştır (74). *CFTR* geni varyantları ile pankreatik divisum birlikteliğinin pankreatit riskini artırdığı, ve birkaç geçmiş çalışmada bu birlikteliğe bağlı olarak divisumlu olgularda daha yüksek oranda pankreatit tespit edildiği düşünülmüştür (74, 77). Alazmi ve arkadaşlarının çalışmasında pankreatit vakalarından *CFTR* geninde patojenik değişim saptanan olguların %30'unda pankreatik divisum bildirilmişken, saptanmayan olguların %20'sinde pankreatik divisum birlikteliğinden bahsedilmiştir (284). Bizim çalışmamızda *CFTR* geninde varyasyonlar taşıyıp görüntüleme yöntemleri uygulanabilen 8 olgunun 2 (%25)'sinde pankreatik divisum olduğu belirlendi. *PRSSI*, *SPINK1* ve *CTRC* varyantı taşıyıp görüntüleme yöntemleri uygulanabilen olguların hiçbirinde pankreatik divisum bulunmazken, *CFTR* geninde varyant bulunmayan 37 olgunun 6 (%16,2)'sında tespit edilmiştir (Tablo 5.2.). Ayrıca pankreatik divisumlu 8 olgumuzun 2 (%25)'sinde *CFTR* geni dizi varyantları tespit edilmiştir (Tablo 5.3.). *CFTR* varyantı olan olgularda olmayanlara göre pankreatik divisumun daha sık görülmesi (%25 - %16,2) ve yine pankreatik divisumlu olgularda *CFTR* varyantlarının diğer olgulara oranla daha sık olarak gözleniyor olması (%25 - %16,2) *CFTR* varyantlarının ilişkisini pankreatik divisumla destekler niteliktedir.

Tablo 5.2. Geçmiş yayınlar ile mevcut çalışmada genetik risk faktörleri tespit edilen pankreatit olgularında pankreatik divisum bulunma oranlarının karşılaştırılması

Tanı Grubu	Yaş Grubu	PRSSI	SPINK1	CTRC	CFTR	Kaynak
İP	5-24	2/12 (%16,7)	1/14 (%7,1)	-	1/8 (%12,5)	Tomaszewska vd., 2006 (275)
RAP + KP	15-75	3/19 (%15,8)	4/25 (%16,0)	-	14/30 (%46,7)	Bertin vd., 2012 (74)
İRAP + İKP	3-70	- (%18,2)	- (%12,5)	-	- (%5,9)	Hamoir vd., 2013 (274)
İP	5-70	0/8 (%0,0)	0/3 (%0,0)	0/1 (%0,0)	2/8 (%25,0)	Mevcut çalışma
İP: İdiyopatik pankreatit, RAP: Rekürren akut pankreatit, KP: Kronik pankreatit İRAP: İdiyopatik rekürren akut pankreatit, İKP: İdiyopatik kronik pankreatit						

Tablo 5.3. Geçmiş yayınlar ile mevcut çalışmada pankreatik pivismumlu pankreatit olgularında saptanan genetik varyasyon oranlarının karşılaştırılması

Tanı Grubu	Yaş Grubu	PRSSI	SPINK1	CTRC	CFTR	Kaynak
AP + RAP + KP		-	-	-	8/37 (%21,6)	Choudari vd., 2004 (77)
RAP	15-47	0/12 (%0,0)	5/12 (%41,7)	-	5/12 (%41,7)	Garg vd., 2009 (76)
RAP + KP	<18	1/6 (%16,7)	3/6 (%50,0)	-	-	Lee vd., 2011 (204)
İRAP + İKP	<19	4/42 (%9,5)	12/40 (%30)	3/27 (%11,1)	15/41 (%36,6)	Lin vd., 2019 (72)
İP	11-48	0/8 (%0,0)	0/8 (%0,0)	0/8 (%0,0)	2/8 (%25,0)	Mevcut çalışma
AP: Akut pankreatit, RAP: Rekürren akut pankreatit, KP: Kronik pankreatit İRAP: İdiyopatik rekürren akut pankreatit, İKP: İdiyopatik kronik pankreatit						

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

“Pankreatit olgularının genetik analiz algoritmasında NGS ve MLPA analizlerinin yapılması gereklidir” hipotezi ile başlattığımız çalışmamızda vaka grubumuzda NGS analizleri olgularımızın %38,8’inde klinik öneme sahip olabilecek dizi varyantları olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca toplumda yaygın bulunan *CTRC* geninin c.180C>T (p.G60G) dizi varyantı ile *CFTR* geninin IVS8-5T ile c.1408G>A varyantlarının frekansı arasında vakalarımızla kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Olgularımızda genlere çok spesifik fenotipik özelliklerin bulunmaması ve olguların önemli bir kısmında kompleks genetik etiyoloji saptanması, pankreatitin genetik tanısında tek gen sekanslama yerine gen panellerinin çalışılmasının önemini göstermektedir. MLPA yöntemi ile literatür bilgisinin aksine hiçbir olgumuzda kopya sayısı varyasyonlarının tespit edilmemesi ise, MLPA’nın pankreatit olgularının genetik analiz algoritmasında yerinin kısıtlı olduğunu göstermiş, sadece güçlü genetik etiyoloji şüphesi olan (erken yaşta başlayan semptomlar, pozitif aile öyküsü) ve diğer yöntemlerle genetik tanı alamayan ailelerde kullanılmasının daha makul olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda *PRSSI*, *CTRC* ve *CFTR* varyantlarının oranları genel olarak vaka grubumuzda diğer toplumlardaki çalışmalarla uyumlu bulunmuş; etnik kökene bağlı farklılıkların sık görüldüğü *SPINK1* geni varyasyonlarının örneklemimizde Asya toplumlarından oldukça düşük, ancak Batı toplumlarıyla benzer oranda olduğu belirlenmiştir. *SPINK1* varyant oranımız Batı toplumlarıyla benzer bulunsa da, Batı toplumlarında oldukça sık bildirilen p.N34S varyantına örneklemimizde rastlanmamış, ve daha önce diğer toplumlarda pankreatit riskiyle hiç ilişkilendirilmemiş yeni *SPINK1* varyantları tespit edilmiştir. Ancak örneklemimizde tespit ettiğimiz sonuçların bölgesel genetik etiyopatogenezi yansıtıp, ülkemizin tüm bölgelerindeki genetik risk faktörlerini yansıtmayabileceği öngörülmüştür. Buna rağmen, örneklemimizdeki pankreatit etiyopatogenezinin diğer toplumlardan farklı olmasının özellikle klinisyenlerin pankreatit tanı ve tedavisindeki yaklaşımlarını değiştirebileceği ve toplumumuzda bu tarz genetik çalışmaların artarak daha kapsamlı verilere ulaşılmasının gerekliliği görülmüştür.

Vaka grubumuzda pankreatit ilişkili semptomları 18 yaş öncesinde başlayan olgularda genetik etiyopatogenezin daha yüksek olduğu belirgin; güncel kılavuzlarda belirtilen genetik testlerin sadece semptomları 35 yaş altında başlayan olgularda planlanması önerisinin, bazı ailelerde risk faktörlerinin atlanabileceğine ve ailelerin gerekli tedaviler ile genetik danışmanlık almasını önleyeceği görülmüştür. Ayrıca yine aile öyküsü pozitif vakalarda genetik etiyopatogenez daha belirgin, aile öyküsü negatif olguların da önemli kısmında genetik risk faktörleri tespit edilmesi, hatta bazılarında *PRSSI* geninin p.R122H varyantı gibi yüksek penetran varyasyonların saptanması, idiyopatik pankreatit vakalarında aile öyküsünden bağımsız olarak gerekli genetik testlerin planlanmasının gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

Genetik risk faktörleri tespit edilen olgular ve aileleri, genetik danışmanlık hizmetlerinden faydalanma imkanına erişmişlerdir. Saptanan genetik değişimler ayrıca olguların olası tedavilere yanıtlarının değerlendirilmesinde de kullanılabileceği göz önüne alınarak herediter pankreatit tanısı alan olgularımızda kronik pankreatite ve malignitelere ilerleyişi durdurmak için önleyici tedavilerin önemi üzerinde ciddiyetle durulmuştur. *CFTR* geninde varyasyonlar saptadığımız vakalarda her geçen gün daha fazla mutasyon için uyarlanan *CFTR* modülatörleri tedavilerinin yakın gelecekte kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu ailelere kistik fibrozis ilişkili hastalıklar açısından da genetik danışmanlık verilmiş, ve sonraki nesillerde gelişebilecek daha ağır hastalıkların önüne geçilmesi mümkün olmuştur.

Çalışmanın çeşitli kısıtlılıkları bulunmaktadır. Çalışmamızda sadece pankreatitle en sık ilişkilendirilmiş *PRSSI*, *SPINK1*, *CTRC* ve *CFTR* genleri çalışılmış; pankreatitle ilişkisi yeni ortaya konulmuş diğer genler analiz edilememiştir. Bu durum da 12, 38 ve 42 nolu olgularımız gibi aile öyküsü de olduğu halde herhangi bir genetik risk faktörü tespit edilememiş olgularda ya da pankreatit ilişkili semptomları oldukça erken yaşlarda başlayıp herhangi bir risk faktörü tespit edilmeyen 6, 14 ve 17 nolu olgularımızdaki muhtemel patojenik değişimlerin atlanmış olmasına sebep olabilir.

Görece olarak kısıtlı bir hasta popülasyonu üzerinde analizlerin planlanmasının özellikle kopya sayısı değişimleri ile ilgili anlamlı bir sonuca ulaşmamıza engel olduğu

düşünülmektedir. Ayrıca vaka sayısının kısıtlı olması, genetik varyant saptanan olgularda klinikle ilişki kurmaya mani olmuş; pankreatik divisum-pankreatit genetiği, gen-gen etkileşimleri, pankreatit alt tanı gruplarında genetik etiyopatogenez, genotip-fenotip ilişkileri gibi alanlarda kesin çıkarımlarda bulunulamamıştır. Aydınlatılması gereken bu konular için daha büyük vaka gruplarında, daha detaylı ve daha uzun süreli prospektif çalışmaların planlanması ve bu çalışmalarda pankreatitle ilişkisi yeni tanımlanmış genlerin de incelenmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Sbarounis CN. Did Alexander the Great die of acute pancreatitis? 1997.
2. O'Reilly D, Kingsnorth AJJotRSoM. A brief history of pancreatitis. 2001;94(3):130-2.
3. Fitz RHJTBM, Journal S. Acute pancreatitis: a consideration of pancreatic hemorrhage, hemorrhagic, suppurative, and gangrenous pancreatitis, and of disseminated fat-necrosis. 1889;120(8):181-7.
4. Chiari HJZH. Uber die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. 1896;17:69-96.
5. Comfort MW, Steinberg AGJG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. 1952;21(1):54-63.
6. 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. 1996;14(2):141-5.
7. Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, Bakhti MJD. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. 2017;144(16):2873-88.
8. Leung PS. Overview of the Pancreas. *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*: Springer; 2010. p. 3-12.
9. Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD, editors. Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Seminars in cell & developmental biology*; 2012: Elsevier.
10. Proshchina AE, Krivova YS, Barabanov VM, Saveliev SV. Pancreatic endocrine cell arrangement during human ontogeny. *Acta histochemica*. 2019;121(5):638-45.
11. LaRusch J, Solomon S, Whitcomb DC. Pancreatitis overview. *GeneReviews®[Internet]*: University of Washington, Seattle; 2014.

12. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NAJD. Human pancreas development. 2015;142(18):3126-37.
13. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CVJNg. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. 2002;32(1):128-34.
14. Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV, Magnuson MAJDb. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. 2008;316(1):74-86.
15. Stanger BZ, Tanaka AJ, Melton DAJN. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. 2007;445(7130):886-91.
16. Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature—An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2019;221:115-24.
17. Mortelé KJ, Rocha TC, Streeter JL, Taylor AJ. Multimodality imaging of pancreatic and biliary congenital anomalies. *Radiographics*. 2006;26(3):715-31.
18. Capito C, Simon M-T, Aiello V, Clark A, Aigrain Y, Ravassard P, et al. Mouse muscle as an ectopic permissive site for human pancreatic development. 2013;62(10):3479-87.
19. Salisbury RJ, Blaylock J, Berry AA, Jennings RE, De Krijger R, Piper Hanley K, et al. The window period of NEUROGENIN3 during human gestation. 2014;6(3):e954436.
20. Gu G, Dubauskaite J, Melton DAJD. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. 2002;129(10):2447-57.

21. Hanley KP, Hearn T, Berry A, Carvell MJ, Patch A-M, Williams LJ, et al. In vitro expression of NGN3 identifies RAB3B as the predominant Ras-associated GTP-binding protein 3 family member in human islets. 2010;207(2):151.
22. Jennings RE, Berry AA, Kirkwood-Wilson R, Roberts NA, Hearn T, Salisbury RJ, et al. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. 2013;62(10):3514-22.
23. Riedel M, Asadi A, Wang R, Ao Z, Warnock G, Kieffer TJD. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. 2012;55(2):372-81.
24. Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, Edlund H, Diez JAJJoH, Cytochemistry. Endocrine cell clustering during human pancreas development. 2009;57(9):811-24.
25. Lyttle B, Li J, Krishnamurthy M, Fellows F, Wheeler M, Goodyer C, et al. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. 2008;51(7):1169-80.
26. Meier JJ, Köhler CU, Alkhatib B, Sergi C, Junker T, Klein HH, et al. β -cell development and turnover during prenatal life in humans. 2010;162(3):559-68.
27. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti. 2001:307-9.
28. Prasanna LC, Rajagopal K, Thomas HR, Bhat KM. Accessory pancreatic duct patterns and their clinical implications. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2015;9(3):AC05.
29. Klein SD, Affronti JP. Pancreas divisum, an evidence-based review: part I, pathophysiology. Gastrointestinal endoscopy. 2004;60(3):419-25.
30. Hegyi P, Petersen OH. The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 165: Springer; 2013. p. 1-30.

31. Guyton A, Hall J. Textbook of medical physiology 11th edition Elsevier Inc. Philadelphia PA. 2006.
32. Szmola R, Sahin-Tóth MJPotNAoS. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. 2007;104(27):11227-32.
33. Mayerle J, Sendler M, Hegyi E, Beyer G, Lerch MM, Sahin-Tóth MJG. Genetics, cell biology, and pathophysiology of pancreatitis. 2019;156(7):1951-68. e1.
34. Rinderknecht HJDd, sciences. Activation of pancreatic zymogens. 1986;31(3):314-21.
35. Kasai H, Augustine GJJN. Cytosolic Ca²⁺ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. 1990;348(6303):735-8.
36. Petersen OH, Tepikin AVJARP. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. 2008;70:273-99.
37. Gerasimenko JV, Gryshchenko O, Ferdek PE, Stapleton E, Hébert TO, Bychkova S, et al. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(32):13186-91.
38. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, et al. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(24):13126-31.
39. Zator Z, Whitcomb DC. Insights into the genetic risk factors for the development of pancreatic disease. Therapeutic advances in gastroenterology. 2017;10(3):323-36.

40. Szmola R, Bence M, Carpentieri A, Szabó A, Costello CE, Samuelson J, et al. Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. 2011;286(3):1819-27.
41. Wartmann T, Mayerle J, Kähne T, Sahin-Tóth M, Ruthenbürger M, Matthias R, et al. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. 2010;138(2):726-37.
42. Hegyi E, Sahin-Tóth M, JDD, sciences. Genetic risk in chronic pancreatitis: the trypsin-dependent pathway. 2017;62(7):1692-701.
43. Laskowski Jr M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. Annual review of biochemistry. 1980;49(1):593-626.
44. Weiss FU. Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis. Frontiers in physiology. 2014;5:70.
45. Szabó A, Sahin-Tóth M, JJoBC. Increased activation of hereditary pancreatitis-associated human cationic trypsinogen mutants in presence of chymotrypsin C. 2012;287(24):20701-10.
46. Nemoda Z, Sahin-Tóth M, JJoBC. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. 2006;281(17):11879-86.
47. Németh BC, Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2014;306(6):G466-G73.
48. Bramswig NC, Kaestner KH. Organogenesis and functional genomics of the endocrine pancreas. Cellular and Molecular Life Sciences. 2012;69(13):2109-23.
49. Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Neural control of the endocrine pancreas. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2014;28(5):745-56.

50. Peery AF, Crockett SD, Murphy CC, Lund JL, Dellon ES, Williams JL, et al. Burden and cost of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States: update 2018. *Gastroenterology*. 2019;156(1):254-72. e11.
51. Guda NM, Muddana V, Whitcomb DC, Levy P, Garg P, Cote G, et al. Recurrent acute pancreatitis: international state-of-the-science conference with recommendations. *Gastroenterology*. 2018;47(6):653-66.
52. Jalaly NY, Moran RA, Fargahi F, Khashab MA, Kamal A, Lennon AM, et al. An evaluation of factors associated with pathogenic PRSS1, SPINK1, CTFR, and/or CTRC genetic variants in patients with idiopathic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2017;112(8):1320-9.
53. Crockett SD, Wani S, Gardner TB, Falck-Ytter Y, Barkun AN, Crockett S, et al. American Gastroenterological Association Institute guideline on initial management of acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2018;154(4):1096-101.
54. Pendharkar SA, Salt K, Plank LD, Windsor JA, Petrov MS. Quality of life after acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas*. 2014;43(8):1194-200.
55. 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. *Gastroenterology*. 2013;62(1):102-11.
56. Van Dijk SM, Hallensleben ND, van Santvoort HC, Fockens P, van Goor H, Bruno MJ, et al. Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut*. 2017;66(11):2024-32.
57. Pham A, Forsmark CJF. Chronic pancreatitis: review and update of etiology, risk factors, and management. *Gastroenterology*. 2018;7.
58. Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, Esposito I, Lerch MM, Gress T, et al. Chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2017;3(1):1-18.

59. Bang UC, Benfield T, Hyldstrup L, Bendtsen F, Jensen JEB. Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study. *Gastroenterology*. 2014;146(4):989-94. e1.
60. Sankaran SJ, Xiao AY, Wu LM, Windsor JA, Forsmark CE, Petrov MSJG. Frequency of progression from acute to chronic pancreatitis and risk factors: a meta-analysis. 2015;149(6):1490-500. e1.
61. Xiao AY, Tan ML, Wu LM, Asrani VM, Windsor JA, Yadav D, et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. 2016;1(1):45-55.
62. Shah AP, Mourad MM, Bramhall SRJ. Acute pancreatitis: current perspectives on diagnosis and management. 2018;11:77.
63. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, et al. Guidelines for the management of acute pancreatitis. 2002;17:S15-S39.
64. Machado JD, Yadav DJ. Epidemiology of recurrent acute and chronic pancreatitis: similarities and differences. 2017;62(7):1683-91.
65. Lévy P, Domínguez-Muñoz E, Imrie C, Löhr M, Maisonneuve P. Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. *United European gastroenterology journal*. 2014;2(5):345-54.
66. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. 2013;108(9):1400-15.
67. Guda NM, Trikudanathan G, Freeman ML. Idiopathic recurrent acute pancreatitis. 2018;3(10):720-8.
68. Lee PJ, Papachristou GI. New insights into acute pancreatitis. 2019;1.

69. Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Archives of internal medicine*. 2009;169(11):1035-45.
70. Zou W-B, Ru N, Wu H, Hu L-H, Ren X, Jin G, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic pancreatitis in China (2018 edition). *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*. 2019;18(2):103.
71. Shelton C, LaRusch J, Whitcomb DC. GeneReviews - Pancreatitis Overview: GeneReviews® [Internet]; 2020 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190101/>].
72. Lin TK, Abu-El-Haija M, Nathan JD, Palermo JP, Barth B, Bellin M, et al. Pancreas Divisum in Pediatric Acute Recurrent and Chronic Pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2019;53(6):e232-e8.
73. Dhar A, Goenka M, Kochhar R, Nagi B, Bhasin D, Singh K. Pancrease divisum: five years' experience in a teaching hospital. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 1996;15(1):7-9.
74. Bertin C, Pelletier A-L, Vullierme MP, Bienvenu T, Rebours V, Hentic O, et al. Pancreas divisum is not a cause of pancreatitis by itself but acts as a partner of genetic mutations. 2012;107(2):311-7.
75. Spicak J, Poulouva P, Plucnarova J, Rehor M, Filipova H, Hucl T. Pancreas divisum does not modify the natural course of chronic pancreatitis. *Journal of gastroenterology*. 2007;42(2):135-9.
76. Garg PK, Khajuria R, Kabra M, Shastri SS. Association of SPINK1 gene mutation and CFTR gene polymorphisms in patients with pancreas divisum presenting with idiopathic pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2009;43(9):848-52.
77. Choudari C, Imperiale TF, Sherman S, Fogel E, Lehman GA. Risk of pancreatitis with mutation of the cystic fibrosis gene. *LWW*; 2004.

78. Saluja A, Dudeja V, Dawra R, Sah RP. Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis. *Gastroenterology*. 2019;156(7):1979-93.
79. Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OHJTJop. The role of Ca²⁺ in the pathophysiology of pancreatitis. 2014;592(2):269-80.
80. Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP, et al. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. 2006;130(3):781-93.
81. Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, et al. Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. 2006;281(52):40154-63.
82. Gerasimenko JV, Lur G, Sherwood MW, Ebisui E, Tepikin AV, Mikoshiba K, et al. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca²⁺ release via acid store IP₃ receptors. 2009;106(26):10758-63.
83. Petersen OH, Tepikin A, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Sutton R, Criddle DJCc. Fatty acids, alcohol and fatty acid ethyl esters: toxic Ca²⁺ signal generation and pancreatitis. 2009;45(6):634-42.
84. Maléth J, Hegyi P. Ca²⁺ toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;371(1700):20150425.
85. Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard J, Steer M. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999;276(4):G835-G42.
86. 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.

87. Halangk 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.
88. Chvanov M, De Faveri F, Moore D, Sherwood MW, Awais M, Voronina S, et al. Intracellular rupture, exocytosis and actin interaction of endocytic vacuoles in pancreatic acinar cells: initiating events in acute pancreatitis. 2018;596(13):2547-64.
89. Talukdar R, Sareen A, Zhu H, Yuan Z, Dixit A, Cheema H, et al. Release of cathepsin B in cytosol causes cell death in acute pancreatitis. 2016;151(4):747-58. e5.
90. Louhimo JM, Steer ML, Perides G. Necroptosis is an important severity determinant and potential therapeutic target in experimental severe pancreatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2016;2(4):519-35.
91. Han J, Zhong C-Q, Zhang D-W. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature immunology*. 2011;12(12):1143-9.
92. Antonucci L, Fagman JB, Kim JY, Todoric J, Gukovsky I, Mackey M, et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(45):E6166-E74.
93. Mareninova OA, Hermann K, French SW, O'Konski MS, Pandol SJ, Webster P, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(11):3340-55.
94. Maléth J, Balázs A, Pallagi P, Balla Z, Kui B, Katona M, et al. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

- to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015;148(2):427-39. e16.
95. Venglovecz V, Pallagi P, Kemény LV, Balázs A, Balla Z, Becskeházi E, et al. The importance of aquaporin 1 in pancreatitis and its relation to the CFTR Cl⁻ channel. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:854.
 96. Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut*. 2011;60(4):544-52.
 97. Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol S, JJAJoP-G, Physiology L. Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. 1998;275(6):G1402-G14.
 98. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RMJG. NF- κ B/Rel activation in cerulein pancreatitis. 1999;116(2):420-30.
 99. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C, Jiang T, therapy t. NF- κ B signaling in inflammation. 2017;2(1):1-9.
 100. Sendler M, Dummer A, Weiss FU, Krüger B, Wartmann T, Scharffetter-Kochanek K, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. 2013;62(3):430-9.
 101. Sendler M, Weiss F-U, Golchert J, Homuth G, van den Brandt C, Mahajan UM, et al. Cathepsin B-mediated activation of trypsinogen in endocytosing macrophages increases severity of pancreatitis in mice. 2018;154(3):704-18. e10.
 102. Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lulis AJ, Brennan ML, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. 2002;122(4):974-84.

103. Perides G, Weiss ER, Michael ES, Laukkarinen JM, Duffield JS, Steer MLJJoBC. TNF- α -dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6Chi monocytes in mice. 2011;286(15):13327-35.
104. Bhanot UK, Möller P. Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Laboratory investigation*. 2009;89(5):489-97.
105. Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1292-302.
106. Leung PS, Chan YC. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(1):135-66.
107. Krishna SG, Kamboj AK, Hart PA, Hinton A, Conwell DLJP. The changing epidemiology of acute pancreatitis hospitalizations: a decade of trends and the impact of chronic pancreatitis. 2017;46(4):482.
108. Das SL, Singh PP, Phillips AR, Murphy R, Windsor JA, Petrov MSJG. Newly diagnosed diabetes mellitus after acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. 2014;63(5):818-31.
109. Hollemans RA, Hallensleben ND, Mager DJ, Kelder JC, Besselink MG, Bruno MJ, et al. Pancreatic exocrine insufficiency following acute pancreatitis: Systematic review and study level meta-analysis. 2018;18(3):253-62.
110. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates Jr LK, Perrault J, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. 1997;89(6):442-6.
111. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2004;2(3):252-61.

112. Kirkegård J, Cronin-Fenton D, Heide-Jørgensen U, Mortensen FV. Acute pancreatitis and pancreatic cancer risk: a nationwide matched-cohort study in Denmark. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1729-36.
113. Chung S-D, Chen K-Y, Xirasagar S, Tsai M-C, Lin H-C. More than 9-times increased risk for pancreatic cancer among patients with acute pancreatitis in Chinese population. *Pancreas*. 2012;41(1):142-6.
114. Sadr-Azodi O, Oskarsson V, Discacciati A, Videhult P, Askling J, Ekblom A. Pancreatic cancer following acute pancreatitis: a population-based matched cohort study. *American Journal of Gastroenterology*. 2018;113(11):1711-9.
115. Hasan A, Moscoso DI, Kastrinos FJGEC. The role of genetics in pancreatitis. 2018;28(4):587-603.
116. Weiss FU, Laemmerhirt F, Lerch MM. Etiology and risk factors of acute and chronic pancreatitis. *Visceral medicine*. 2019;35(2):73-81.
117. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science*. 1996;272(5269):1755-62.
118. Kereszturi É, Szmola R, Kukor Z, Simon P, Ulrich Weiss F, Lerch MM, et al. Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen: a novel disease mechanism. 2009;30(4):575-82.
119. Pfützner 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. 2000;119(3):615-23.
120. 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. 2000;25(2):213-6.
121. Muller N, Sarantis I, Rouanet M, de Mestier L, Halloran C, Greenhalf W, et al. Natural history of SPINK1 germline mutation related-pancreatitis. *EBioMedicine*. 2019;48:581-91.

122. Zou W-B, Tang X-Y, Zhou D-Z, Qian Y-Y, Hu L-H, Yu F-F, et al. SPINK1, PRSS1, CTRC, and CFTR genotypes influence disease onset and clinical outcomes in chronic pancreatitis. *Clinical and translational gastroenterology*. 2018;9(11).
123. Aoun E, Muddana V, Papachristou GI, Whitcomb DC. SPINK1N34S Is Strongly Associated With Recurrent Acute Pancreatitis but Is Not a Risk Factor for the First or Sentinel Acute Pancreatitis Event. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(2):446-51.
124. Aoun E, Chang C-CH, 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).
125. Di Leo M, Bianco M, Zuppardo RA, Guslandi M, Calabrese F, Mannucci A, et al. Meta-analysis of the impact of SPINK1 p. N34S gene variation in Caucasian patients with chronic pancreatitis. An update. 2017;49(8):847-53.
126. 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.
127. Truninger K, Witt H, Köck J, Kage A, Seifert B, Ammann RW, et al. Mutations of the serine protease inhibitor, Kazal type 1 gene, in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(5):1133-7.
128. Suzuki M, Shimizu T. Is SPINK1 gene mutation associated with development of pancreatic cancer? New insight from a large retrospective study. *EBioMedicine*. 2019;50:5-6.
129. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ózsvári B, Landt O, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. 2008;40(1):78-82.

130. Masson E, Chen J-M, Scotet V, Le Maréchal C, Férec C. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Human genetics*. 2008;123(1):83-91.
131. LaRusch J, Lozano-Leon A, Stello K, Moore A, Muddana V, O'connell M, et al. The common chymotrypsinogen C (CTRC) variant G60G (C. 180T) increases risk of chronic pancreatitis but not recurrent acute pancreatitis in a North American population. 2015;6(1):e68.
132. Paliwal S, Bhaskar S, Mani KR, Reddy DN, Rao GV, Singh SP, et al. Comprehensive screening of chymotrypsin C (CTRC) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. 2013;62(11):1602-6.
133. Szmola R, Sahin-Tóth MJG. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. 2010;59(3):365-72.
134. Beer S, Zhou J, Szabó A, Keiles S, Chandak GR, Witt H, et al. Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. 2013;62(11):1616-24.
135. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-s, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. 1989;245(4922):1059-65.
136. Kerem B-s, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. 1989;245(4922):1073-80.
137. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-s, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. 1989;245(4922):1066-73.
138. Deignan JL, Astbury C, Cutting GR, Del Gaudio D, Gregg AR, Grody WW, et al. CFTR variant testing: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). 2020:1-8.

139. Hegyi P, Wilschanski M, Muallem S, Lukacs GL, Sahin-Tóth M, Uc A, et al. CFTR: a new horizon in the pathomechanism and treatment of pancreatitis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Vol 170: Springer; 2016. p. 37-66.
140. 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. *1998;339(10):645-52.*
141. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PSJNEJoM. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *1998;339(10):653-8.*
142. Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2012;11(5):355-62.
143. LaRusch J, Jung J, General IJ, Lewis MD, Park HW, Brand RE, et al. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004376.
144. Masson E, Chen J-M, Audrézet M-P, Cooper DN, Férec CJPo. 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. *2013;8(8).*
145. Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, Kovacs P, Teich N, Bödeker H, et al. CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut.* 2013;62(4):582-92.
146. Zhou D, Bai R, Wang L. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator 470 Met Allele Is Associated with an Increased Risk of Chronic Pancreatitis in Both Asian and Caucasian Populations: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers.* 2020;24(1):24-32.

147. 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*. 2006;8(6):339-45.
148. Chu C-S, 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.
149. Dörk T, Fislage R, Neumann T, Wulf B, Tümmler B. Exon 9 of the CFTR gene: splice site haplotypes and cystic fibrosis mutations. *Human genetics*. 1994;93(1):67-73.
150. 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):426-30.
151. Strong TV, Wilkinson DJ, Monsoura 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.
152. Raju SV, Jackson PL, Courville CA, McNicholas CM, Sloane PA, Sabbatini G, et al. Cigarette smoke induces systemic defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(11):1321-30.
153. 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.
154. Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen J-M, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. 2013;45(10):1216.

155. Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, Rosendahl J, Chen J-M, Johansson BB, et al. A recombined allele of the lipase gene *CEL* and its pseudogene *CELP* confers susceptibility to chronic pancreatitis. 2015;47(5):518-22.
156. Zou W-B, Boulling A, Masamune A, Issarapu P, Masson E, Wu H, et al. No association between *CEL*-*HYB* hybrid allele and chronic pancreatitis in Asian populations. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1558-60. e5.
157. Rosendahl J, Kirsten H, Hegyi E, Kovacs P, Weiss FU, Laumen H, et al. Genome-wide association study identifies inversion in the *CTRB1*-*CTRB2* locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut*. 2018;67(10):1855-63.
158. Tang X-Y, Zou W-B, Masson E, Hu L-H, Férec C, Chen J-M, et al. The *CTRB1*-*CTRB2* risk allele for chronic pancreatitis discovered in European populations does not contribute to disease risk variation in the Chinese population due to near allele fixation. *Gut*. 2018;67(7):1368-9.
159. Whitcomb DC, LaRusch J, Krasinskas AM, Klei L, Smith JP, Brand RE, et al. Common genetic variants in the *CLDN2* and *PRSS1*-*PRSS2* loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. 2012;44(12):1349.
160. Muddana V, Lamb J, Greer JB, Elinoff B, Hawes RH, Cotton PB, et al. Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. 2008;14(28):4486.
161. Masson E, Chen J-M, Férec CJP. Overrepresentation of rare *CASR* coding variants in a sample of young French patients with idiopathic chronic pancreatitis. 2015;44(6):996-8.
162. Zou WB, Wang YC, Ren XL, Wang L, Deng SJ, Mao XT, et al. *TRPV6* variants confer susceptibility to chronic pancreatitis in the Chinese population. *Human Mutation*. 2020.

163. Sofia VM, Da Sacco L, Surace C, Tomaiuolo AC, Genovese S, Grotta S, et al. Extensive molecular analysis suggested the strong genetic heterogeneity of idiopathic chronic pancreatitis. *Molecular Medicine*. 2016;22(1):300-9.
164. Masson E, Zou W-B, Ruffert C, Holste V, Michl P, Mossner J, et al. Genetic analysis of the STIM1 gene in chronic pancreatitis. *bioRxiv*. 2019:691899.
165. Witt H, Sahin-Tóth M, Landt O, Chen J-M, Kähne T, Drenth JP, et al. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. 2006;38(6):668-73.
166. Santhosh S, Witt H, Te Morsche RH, Nemoda Z, Molnár T, Pap A, et al. A loss of function polymorphism (G191R) of anionic trypsinogen (PRSS2) confers protection against chronic pancreatitis. 2008;36(3):317-20.
167. Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, et al. A loss-of-function p. G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. 2009;58(6):820-4.
168. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Le Maréchal C, Hentic O, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*. 2009;58(1):97-103.
169. Masamune A. Genetics of pancreatitis: the 2014 update. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2014;232(2):69-77.
170. Rebours V, Lévy P, Ruzsniwski P. An overview of hereditary pancreatitis. *Digestive and Liver Disease*. 2012;44(1):8-15.
171. Cazacu IM, Farkas N, Garami A, Balaskó M, Mosdósi B, Alizadeh H, et al. Pancreatitis-associated genes and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas*. 2018;47(9):1078.
172. Schubert S, Traub F, Brakensiek K, von Kopylow K, Marohn B, Maelzer M, et al. CFTR, SPINK1, PRSS1, and CTRC mutations are not associated with pancreatic cancer in German patients. *Pancreas*. 2014;43(7):1078-82.

173. Shindo K, Yu J, Suenaga M, Fesharakizadeh S, Tamura K, Almario JAN, et al. Lack of association between the pancreatitis risk allele CEL-HYB and pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017;8(31):50824.
174. Dalva M, El Jellas K, Steine SJ, Johansson BB, Ringdal M, Torsvik J, et al. Copy number variants and VNTR length polymorphisms of the carboxyl-ester lipase (CEL) gene as risk factors in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2017;17(1):83-8.
175. Frulloni L, Castellani C, Bovo P, Vaona B, Calore B, Liani C, et al. Natural history of pancreatitis associated with cystic fibrosis gene mutations. 2003;35(3):179-85.
176. Keim V, Witt H, Bauer N, Bodeker H, Rosendahl J, Teich N, et al. The course of genetically determined chronic pancreatitis. 2003;4(4):146-54.
177. Wen L, Voronina S, Javed MA, Awais M, Szatmary P, Latawiec D, et al. Inhibitors of ORAI1 prevent cytosolic calcium-associated injury of human pancreatic acinar cells and acute pancreatitis in 3 mouse models. *Gastroenterology*. 2015;149(2):481-92. e7.
178. Javed MA, Wen L, Awais M, Latawiec D, Huang W, Chvanov M, et al. TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death. *Pancreas*. 2018;47(1):18.
179. Mukherjee R, Mareninova OA, Odinkova IV, Huang W, Murphy J, Chvanov M, et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut*. 2016;65(8):1333-46.
180. Chinnakotla S, Radosevich DM, Dunn TB, Bellin MD, Freeman ML, Schwarzenberg SJ, et al. Long-term outcomes of total pancreatectomy and islet auto transplantation for hereditary/genetic pancreatitis. 2014;218(4):530-43.

181. Sutton JM, Schmulewitz N, Sussman JJ, Smith M, Kurland JE, Brunner JE, et al. Total pancreatectomy and islet cell autotransplantation as a means of treating patients with genetically linked pancreatitis. 2010;148(4):676-86.
182. Ueda J, Tanaka M, Ohtsuka T, Tokunaga S, Shimosegawa T, Pancreas RCoIDot. Surgery for chronic pancreatitis decreases the risk for pancreatic cancer: a multicenter retrospective analysis. *Surgery*. 2013;153(3):357-64.
183. Morinville VD, Lowe ME, Elinoff BD, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis amlodipine trial: a pilot study of a calcium-channel blocker in hereditary pancreatitis. *Pancreas*. 2007;35(4):308-12.
184. Gentsch M, Mall MAJC. Ion channel modulators in cystic fibrosis. 2018;154(2):383-93.
185. Akshintala VS, Kamal A, Faghieh M, Cutting GR, Cebotaru L, West NE, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators reduce the risk of recurrent acute pancreatitis among adult patients with pancreas sufficient cystic fibrosis. *Pancreatology*. 2019;19(8):1023-6.
186. Johns JD, Rowe SM. The effect of CFTR modulators on a cystic fibrosis patient presenting with recurrent pancreatitis in the absence of respiratory symptoms: a case report. *BMC gastroenterology*. 2019;19(1):123.
187. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445–tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. 2018;379(17):1612-20.
188. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, et al. VX-659–tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. 2018;379(17):1599-611.
189. Shelton CA, Grubs RE, Umapathy C, Yadav D, Whitcomb DC. Impact of hereditary pancreatitis on patients and their families. *Journal of Genetic Counseling*. 2020.

190. Solomon S, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis: an update for clinicians and genetic counselors. *Current gastroenterology reports*. 2012;14(2):112-7.
191. de las Heras-Castaño G, Castro-Senosiain B, Fontalba A, López-Hoyos M, Sánchez-Juán P. Hereditary pancreatitis: clinical features and inheritance characteristics of the R122C mutation in the cationic trypsinogen gene (PRSS1) in six Spanish families. *Jop*. 2009;10(3):249-55.
192. Grocock CJ, Rebours V, Delhaye MN, Andrén-Sandberg Å, Weiss FU, Mountford R, et al. The variable phenotype of the p. A16V mutation of cationic trypsinogen (PRSS1) in pancreatitis families. *Gut*. 2010;59(3):357-63.
193. Shelton C, Solomon S, LaRusch J, Whitcomb DC. PRSS1-related hereditary pancreatitis. *GeneReviews®*[Internet]: University of Washington, Seattle; 2019.
194. Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, Hardwick RJ, Alexandrov LB, Al Turki S, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nature genetics*. 2016;48(2):126-33.
195. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2015;139(4):481-93.
196. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(2):560-4.
197. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 1975;94(3):441-8.
198. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1977;74(12):5463-7.

199. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405-23.
200. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nature Reviews Genetics*. 2018;19(5):253.
201. MLPA: The Gold Standard for DNA Copy Number Determination [Available from: <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>].
202. Uc A, Husain SZ. Pancreatitis in children. *Gastroenterology*. 2019;156(7):1969-78.
203. Dike CR, Zimmerman B, Zheng Y, Wilschanski M, Werlin SL, Troendle D, et al. Clinical and Practice Variations in Pediatric Acute Recurrent or Chronic Pancreatitis: Report From The Inspire Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2020.
204. Lee YJ, Kim KM, Choi JH, Lee BH, Kim G-H, Yoo H-W. High incidence of PRSS1 and SPINK1 mutations in Korean children with acute recurrent and chronic pancreatitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;52(4):478-81.
205. Liu M, Xia T, Zhang D, Hu L, Liao Z, Sun C, et al. Genetic Background and Clinical Characters of Pediatric Chronic Pancreatitis: Data and Implications from the East. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017;2017.
206. Garg P, Narayana D. Changing phenotype and disease behaviour of chronic pancreatitis in India: evidence for gene–environment interactions. *Global health, epidemiology and genomics*. 2016;1.
207. Wejnarska K, Kolodziejczyk E, Wertheim-Tysarowska K, Dadalski M, Sobczynska-Tomaszewska A, Kierkus J, et al. The etiology and clinical course

- of chronic pancreatitis in children with early onset of the disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2016;63(6):665-70.
208. Lucidi V, Alghisi F, Dall'Oglio L, D'Apice MR, Monti L, De Angelis P, et al. The etiology of acute recurrent pancreatitis in children: a challenge for pediatricians. *Pancreas*. 2011;40(4):517-21.
209. Kumar S, Ooi CY, Werlin S, Abu-El-Haija M, Barth B, Bellin MD, et al. Risk factors associated with pediatric acute recurrent and chronic pancreatitis: lessons from INSPPIRE. *JAMA pediatrics*. 2016;170(6):562-9.
210. Palermo JJ, Lin TK, Hornung L, Valencia CA, Mathur A, Jackson K, et al. Genotypic Analysis of Pediatric Patients With Acute Recurrent and Chronic Pancreatitis. *Pancreas*. 2016;45(9):1347.
211. Vue PM, McFann K, Narkewicz MR. Genetic mutations in pediatric pancreatitis. *Pancreas*. 2016;45(7):992-6.
212. Masson E, Le Maréchal C, Levy P, Chuzhanova N, Ruzniewski P, Cooper DN, et al. Co-inheritance of a novel deletion of the entire SPINK1 gene with a CFTR missense mutation (L997F) in a family with chronic pancreatitis. 2007;92(1-2):168-75.
213. Masson E, Le Maréchal C, Chen J-M, Frebourg T, Lerebours E, Férec C. Detection of a large genomic deletion in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *European journal of human genetics*. 2006;14(11):1204-8.
214. Masson E, Le Maréchal C, Chandak GR, Lamoril J, Bezieau S, Mahurkar S, et al. Trypsinogen copy number mutations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2008;6(1):82-8.
215. Le Maréchal C, Masson E, Chen J-M, Morel F, Ruzniewski P, Levy P, et al. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. *Nature genetics*. 2006;38(12):1372-4.

216. Chauvin A, Chen J-M, Quemener S, Masson E, Kehrer-Sawatzki H, Ohmle B, et al. Elucidation of the complex structure and origin of the human trypsinogen locus triplication. *Human molecular genetics*. 2009;18(19):3605-14.
217. Venet T, Masson E, Talbotec C, Billiemaz K, Touraine R, Gay C, et al. Severe infantile isolated exocrine pancreatic insufficiency caused by the complete functional loss of the SPINK1 gene. *Human Mutation*. 2017;38(12):1660-5.
218. Masson E, Hammel P, Garceau C, Bénech C, Quéméner-Redon S, Chen J-M, et al. Characterization of two deletions of the CTRC locus. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013;109(3):296-300.
219. Ong T, Marshall SG, Karczeski BA, Stern DL, Cheng E, Cutting GR. Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens. *GeneReviews®*[Internet]: University of Washington, Seattle; 2017.
220. Affronti J. Chronic pancreatitis and exocrine insufficiency. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2011;38(3):515-37.
221. Li B-R, Pan J, Du T-T, Liao Z, Ye B, Zou W-B, et al. Risk factors for steatorrhea in chronic pancreatitis: a cohort of 2,153 patients. *Scientific reports*. 2016;6:21381.
222. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes care*. 2019;42(Supplement 1):S13-S28.
223. Varsome [Available from: <https://varsome.com/>].
224. Franklin - The Future of Variant Interpretation [Available from: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>].
225. MARRVEL2 [Available from: <http://marrvel.org/>].
226. Genetic Risk Factors in Chronic Pancreatitis 2020 [Available from: <http://pancreasgenetics.org/>].

227. CFTR2 2020 [Available from: <https://cftr2.org/>].
228. Mastermind [cited 2020 12.09.2020]. Available from: <https://mastermind.genomenon.com/>.
229. gnomAD v2.1.1 - genome aggregation database 2020 [Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>].
230. Bravo 2020 [cited 2020. Available from: <https://bravo.sph.umich.edu/freeze8/hg38/>].
231. 4.7KJPN 2020 [cited 2020. Available from: <https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/202001/variants>].
232. Genome Asia 2020 [cited 2020. Available from: <https://browser.genomeasia100k.org/>].
233. GME Variome 2020 [cited 2020. Available from: <http://igm.ucsd.edu/gme/data-browser.php>].
234. Iranome 2020 [cited 2020. Available from: <http://www.iranome.ir/>].
235. Balázs A, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Pathogenic cellular role of the p. L104P human cationic trypsinogen variant in chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016;310(7):G477-G86.
236. Gou S, Yu J, Wang C, Liu T, Cui P, Li X. Three female familial cases of solid pseudopapillary tumors with a protease serine 1 gene mutation. *Pancreas*. 2013;42(1):168-73.
237. Enea A, Pizzol A, Pinon M, Cisarò F, Tandoi F, Arduino C, et al. Hereditary pancreatitis in Paediatrics: the causative role of p. Leu104Pro mutation of cationic trypsinogen gene also in young subjects. *Gut*. 2019;68(4):767-8.
238. Németh BC, Patai ÁV, Sahin-Tóth M, Hegyi P. Misfolding cationic trypsinogen variant p. L104P causes hereditary pancreatitis. *Gut*. 2017;66(9):1727-8.

239. Yilmaz B, Ekiz F, Karakaş E, Aykut A, Sımşek Z, Çoban Ş, et al. A rare PRSS1 mutation in a Turkish family with hereditary chronic pancreatitis. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2012;23(6):826.
240. Werlin S, Konikoff FM, Halpern Z, Barkay O, Yerushalmi B, Broide E, et al. Genetic and electrophysiological characteristics of recurrent acute pancreatitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2015;60(5):675-9.
241. Giefer MJ, Lowe ME, Werlin SL, Zimmerman B, Wilschanski M, Troendle D, et al. Early-onset acute recurrent and chronic pancreatitis is associated with PRSS1 or CTRC gene mutations. *The Journal of pediatrics*. 2017;186:95-100.
242. Nemoda Z, Sahin-Tóth M. The tetra-aspartate motif in the activation peptide of human cationic trypsinogen is essential for autoactivation control but not for enteropeptidase recognition. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(33):29645-52.
243. Oracz G, Kolodziejczyk E, Sobczynska-Tomaszewska A, Wejnarska K, Dadalski M, Grabarczyk AM, et al. The clinical course of hereditary pancreatitis in children—A comprehensive analysis of 41 cases. *Pancreatology*. 2016;16(4):535-41.
244. Zou W-B, Wu H, Boulling A, Cooper DN, Li Z-S, Liao Z, et al. In silico prioritization and further functional characterization of SPINK1 intronic variants. *Human genomics*. 2017;11(1):7.
245. Zou W-B, Boulling A, Masson E, Cooper DN, Liao Z, Li Z-S, et al. Clarifying the clinical relevance of SPINK1 intronic variants in chronic pancreatitis. *Gut*. 2016;65(5):884-6.
246. Cho S-M, Shin S, Lee K-A. PRSS1, SPINK1, CFTR, and CTRC pathogenic variants in Korean patients with idiopathic pancreatitis. *Annals of laboratory medicine*. 2016;36(6):555-60.

247. Grabarczyk AM, Oracz G, Wertheim-Tysarowska K, Anna Kujko A, Wejnarska K, Kolodziejczyk E, et al. Chymotrypsinogen C genetic variants, including c. 180TT, are strongly associated with chronic pancreatitis in pediatric patients. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017;65(6):652-7.
248. Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, Chlopek M. CTRC gene polymorphism (p. G60=; c. 180 C> T) in acute pancreatitis. *BMC gastroenterology*. 2017;17(1):13.
249. Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman J, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of cystic fibrosis*. 2008;7(3):179-96.
250. Kobayashi K, Knowles M, Boucher R, O'Brien W, Beaudet A. Benign missense variations in the cystic fibrosis gene. *American journal of human genetics*. 1990;47(4):611.
251. Strandvik B, Björck E, Fallström M, Gronowitz E, Thountzouris J, Lindblad A, et al. Spectrum of mutations in the CFTR gene of patients with classical and atypical forms of cystic fibrosis from southwestern Sweden: identification of 12 novel mutations. *Genetic testing*. 2001;5(3):235-42.
252. Munthe-Kaas MC, Carlsen KCL, Carlsen K-H, Skinningsrud B, Håland 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.
253. Abulí A, Boada M, Rodríguez-Santiago B, Coroleu B, Veiga A, Armengol L, et al. NGS-based assay for the identification of individuals carrying recessive genetic mutations in reproductive medicine. *Human Mutation*. 2016;37(6):516-23.
254. Claustres M, Thèze C, Des Georges M, Baux D, Girodon E, Bienvenu T, et al. CFTR-France, a national relational patient database for sharing genetic and phenotypic data associated with rare CFTR variants. *Human mutation*. 2017;38(10):1297-315.

255. Trujillano D, Weiss ME, Köster J, Papachristos EB, Werber M, Kandaswamy KK, et al. Validation of a semiconductor next-generation sequencing assay for the clinical genetic screening of CFTR. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2015;3(5):396-403.
256. Raynal C, Baux D, Theze C, Bareil C, Taulan M, Roux AF, et al. A classification model relative to splicing for variants of unknown clinical significance: application to the CFTR gene. *Human mutation*. 2013;34(5):774-84.
257. Sosnay PR, Salinas DB, White TB, Ren CL, Farrell PM, Raraigh KS, et al. Applying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genetics and CFTR2 data to facilitate diagnoses. *The Journal of Pediatrics*. 2017;181:S27-S32. e1.
258. Salinas DB, Sosnay PR, Azen C, Young S, Raraigh KS, Keens TG, et al. Benign outcome among positive cystic fibrosis newborn screen children with non-CF-causing variants. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2015;14(6):714-9.
259. Strom CM, Redman JB, Peng M. The dangers of including nonclassical cystic fibrosis variants in population-based screening panels: p. L997F, further genotype/phenotype correlation data. *Genetics in Medicine*. 2011;13(12):1042-4.
260. Lucarelli M, Narzi L, Pierandrei S, Bruno SM, Stamato A, d'Avanzo M, et al. A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. *Genetics in Medicine*. 2010;12(9):548-55.
261. Gomez Lira M, Benetazzo M, Marzari M, Bombieri C, Belpinati F, Castellani C, et al. High frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator mutation L997F in patients with recurrent idiopathic pancreatitis and in newborns with hypertrypsinemia. *American journal of human genetics*. 2000;66(6):2013.
262. Grangeia A, Alves S, Gonçalves L, Gregório I, Santos A, Barros H, et al. Spectrum of CFTR gene sequence variants in a northern Portugal population. *Pulmonology*. 2018;24(1):3-9.

263. Abu-El-Haija M, Hornung L, Denson LA, Husami A, Lin TK, Matlock K, et al. Prevalence of abnormal glucose metabolism in pediatric acute, acute recurrent and chronic pancreatitis. *PloS one*. 2018;13(10):e0204979.
264. Sosnay PR, Raraigh KS, Gibson RL. Molecular genetics of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: genotype and phenotype. *Pediatric Clinics*. 2016;63(4):585-98.
265. Bishop MD, Freedman SD, Zielenski J, Ahmed N, Dupuis A, Martin S, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and ion channel function in patients with idiopathic pancreatitis. *Human genetics*. 2005;118(3-4):372-81.
266. 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.
267. Chang MC, Chang YT, Wei SC, Tien YW, Liang PC, Jan IS, et al. Spectrum of mutations and variants/haplotypes of CFTR and genotype–phenotype correlation in idiopathic chronic pancreatitis and controls in Chinese by complete analysis. *Clinical genetics*. 2007;71(6):530-9.
268. Wejnarska K, Rygiel AM, Wertheim-Tysarowska K, Kołodziejczyk E, Sobczyńska-Tomaszewska A, Dądalski M, et al. Analysis of clinical course of chronic pancreatitis in children with IVS8-5T variant in comparison with patients with CFTR mutation-related pancreatitis.
269. Evans AC, LaRusch J, Abberbock J, Stello K, Gelrud A, Guda NM, et al. Tu1482 Common genetic susceptibility factors for recurrent acute pancreatitis (RAP) and chronic pancreatitis (CP) in white patients are rare in black patients. 2016.
270. Poddar U, Yachha SK, Borkar V, Srivastava A, Saraswat VA. Clinical profile and treatment outcome of chronic pancreatitis in children: a long-term follow-up study of 156 cases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2017;52(6-7):773-8.

271. Wang W, Sun X-T, Weng X-L, Zhou D-Z, Sun C, Xia T, et al. Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTRC and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study. *BMJ open*. 2013;3(9).
272. Abu-El-Haija M, Valencia CA, Hornung L, Youssef N, Thompson T, Barasa NW, et al. Genetic variants in acute, acute recurrent and chronic pancreatitis affect the progression of disease in children. *Pancreatology*. 2019;19(4):535-40.
273. Koziel D, Gluszek S, Kowalik A, Chlopek M, Pieciak L. Genetic mutations in SPINK1, CFTR, CTRC genes in acute pancreatitis. *BMC gastroenterology*. 2015;15(1):70.
274. Hamoir C, Pepermans X, Piessevaux H, Jouret-Mourin A, Weynand B, Habyalimana J-B, et al. Clinical and morphological characteristics of sporadic genetically determined pancreatitis as compared to idiopathic pancreatitis: higher risk of pancreatic cancer in CFTR variants. *Digestion*. 2013;87(4):229-39.
275. Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Oralewska B, Oracz G, Norek A, Czerska K, et al. Analysis of CFTR, SPINK1, PRSS1 and AAT mutations in children with acute or chronic pancreatitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2006;43(3):299-306.
276. Keiles S, Kammesheidt A. Identification of CFTR, PRSS1, and SPINK1 mutations in 381 patients with pancreatitis. *Pancreas*. 2006;33(3):221-7.
277. Oh H-C, Kim M-H, Choi K-S, Moon S-H, Park DH, Lee SS, et al. Analysis of PRSS1 and SPINK1 mutations in Korean patients with idiopathic and familial pancreatitis. *Pancreas*. 2009;38(2):180-3.
278. Pelletier A-L, Bienvenu T, Rebours V, O'Toole D, Hentic O, Maire F, et al. CFTR gene mutation in patients with apparently idiopathic pancreatitis: lack of phenotype-genotype correlation. *Pancreatology*. 2010;10(2-3):158-64.

279. Joergensen MT, Brusgaard K, Crüger DG, Gerdes A-M, de Muckadell OSB. Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(8):1876-83.
280. Ariga H, Kume K, Masamune A, Shimosegawa T. Su1332 CFTR, PRSS1, and SPINK1 Variants in Japanese Patients With Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013;144(5):S-460.
281. Xiao Y, Yuan W, Yu B, Guo Y, Xu X, Wang X, et al. Targeted gene next-generation sequencing in Chinese children with chronic pancreatitis and acute recurrent pancreatitis. *The Journal of Pediatrics*. 2017;191:158-63. e3.
282. Jiang M, Li Z, Fu S, Xu Y, Tan Y, Jia W, et al. IVS8-5T allele of CFTR is the risk factor in chronic pancreatitis, especially in idiopathic chronic pancreatitis. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2020.
283. Adike A, El Kurdi BI, Gaddam S, Kosiorek HE, Fukami N, Faigel DO, et al. Pancreatitis in patients with pancreas divisum. *Pancreas*. 2017;46(10):e80-e1.
284. Alazmi WM, Fogel EL, Schmidt S, Watkins JL, McHenry L, Sherman S, et al. ERCP findings in idiopathic pancreatitis: patients who are cystic fibrosis gene positive and negative. *Gastrointestinal endoscopy*. 2006;63(2):234-9.

