

Ewa Dwojak

**Ocena wyników biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej
zmian guzowatych trzustki w porównaniu
z obrazem klinicznym.**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jacek Szymeja

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej
i Onkologii Gastroenterologicznej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Michał Drews

Katedra Patomorfologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. Przemysław Majewski

Poznań 2015

*Mojemu Promotorowi,
Panu prof. dr hab. n. med. Jackowi Szmei,
składam gorące podziękowania
za inspirację do napisania pracy, nieocenioną pomoc
dotyczącą zwłaszcza zagadnień z dziedziny chirurgii
oraz wyrozumiałość i cierpliwość.*

*Serdecznie dziękuję
Panu prof. zw. dr hab. Przemysławowi Majewskiemu
za życzliwość oraz cenne uwagi
dotyczące oceny cytologicznej
i histopatologicznej preparatów.*

*Całemu Zespołowi Katedry Patomorfologii Klinicznej
dziękuję za pomoc, wsparcie
oraz miłą atmosferę pracy.*

SPIS TREŚCI

INDEKS SKRÓTÓW.....	4
1. WSTĘP.....	6
2. CEL PRACY.....	14
3. MATERIAŁ I METODY	
3.1. Materiał.....	15
3.2. Metody.....	16
4. WYNIKI	
4.1. Preparaty cytologiczne, archiwalne, wykonane z materiału pobranego z trzustki metodą BAC, wybarwione hematoksyliną i eozyną.....	20
4.2. Preparaty cytologiczne, odbarwione, w których została przeprowadzona reakcja immunocytochemiczna.....	22
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	34
6. DYSKUSJA.....	36
7. WNIOSKI.....	42
8. PIŚMIENNICTWO.....	43
9. SPIS TABEL.....	56
10. SPIS SCHEMATÓW.....	57
11. SPIS RYCIN.....	58
12. STRESZCZENIE.....	59
13. SUMMARY.....	61

DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

INDEKS SKRÓTÓW

- ASCO** – *Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ang. American Society of Clinical Oncology)*
- BAC** – *biopsja aspiracyjna cienkoigłowa*
- BCL-2** – *białko blokując apoptozę, translokacje w genie kodującym je wykryto w dużej liczbie przypadków białaczek limfoidalnych z komórek B (ang. B-cell lymphoma)*
- BRCA2** – *gen kodujący białko BRCA2 (ang. breast cancer type 2 susceptibility protein)*
- CA 19-9** – *determinanta węglowodanowa CA 19-9(ang. carcinoma antygen CA 19-9)*
- CD 56** – *antygen różnicowania komórkowego 56 (ang. cluster of differentiation 56)*
- CDKN2A** – *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
- CEA** – *antygen rakowo-płodowy (ang. carcinoembryonic antigen)*
- DAB** – *diaminobenzzydina (ang. 3,3'-diaminobenzidine)*
- DNA** – *kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. deoxyribonucleic acid)*
- DPC4** – *ang. deletion target in pancreatic carcinoma 4*
- EGTM** – *Europejska Grupa do spraw Markerów Nowotworowych (ang. European Group on Tumor Markers)*
- ERBB2** – *gen kodujący białko ErbB-2, występujące także pod nazwą HER2 (ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)*
- EUS** – *ultrasonografia endoskopowa*
- EUS/FNAB** – *biopsja aspiracyjna cienkoigłowa wykonana przy pomocy ultrasonografii endoskopowej*
- FNAB** – *biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (ang. fine needle aspiration biopsy)*
- GICA** – *antygen towarzyszący nowotworom układu pokarmowego (ang. gastrointestinal carcinoma-associated antigen)*
- H+E** – *hematocylin+eozyna*

ICC	– <i>Immunocytochemia</i>
IHC	– <i>Immunohistochemia</i>
KRAS	– <i>gen kodujący białko KRAS (ang. Kirsten ras sarkoma 2 viral oncogene homolog)</i>
LSAB	– <i>znakowanie streptawidyną – biotyną (ang. labeled streptavidin-biotin)</i>
MCSF	– <i>czynnik stymulujący kolonie makrofagów</i>
MGG	– <i>May Grünwald Giemsa</i>
MLH1	– <i>human mutL homolog 1</i>
NET	– <i>guzy neuroendokrynne (ang. neuro-endocrine tumors)</i>
NSE	– <i>swoista enolaza neuronowa</i>
OZT	– <i>ostre zapalenie trzustki</i>
p53	– <i>białko p53</i>
PAM4	– <i>peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase 4</i>
PCR	– <i>reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase chain reaction)</i>
PGP 9.5	– <i>Protein Gene Product 9.5</i>
TAA	– <i>antygeny związane z nowotworem (ang. tumor associated antigens)</i>
TBS	– <i>wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej Trisem, pH 7,6 (ang. tris-saline Buffet)</i>
TP53	– <i>gen kodujący białko p53</i>
TSA	– <i>swoiste antygeny nowotworowe (ang. tumor specific antigens)</i>
USG	– <i>Ultrasonografia</i>

1. WSTĘP

Rak trzustki to nowotwór, którego częstość występowania pozostaje bez zmian od ponad 50 lat. Zarówno u kobiet jak i mężczyzn stanowi on czwartą najczęstszą przyczynę śmierci w Stanach Zjednoczonych po raku płuc, gruczołu krokowego i piersi oraz jelita grubego. Obecnie w USA stwierdza się u obu płci około 22 tysięcy nowych zachorowań rocznie. Spośród tej liczby zaledwie mniej niż 5% pacjentów może spodziewać się 5-letniego przeżycia, gdyż rak trzustki jest chorobą podstępą, która ujawnia się dopiero w stadium zaawansowanym, kiedy znajduje się już poza możliwością leczenia (6, 34, 80, 94). W dostępnym piśmiennictwie można przeczytać, iż niewiele jest czynników predysponujących do zachorowania na ten nowotwór. Do tej nielicznej grupy bez wątplenia należy nikotynizm. U palaczy tytoniu ryzyko wystąpienia raka trzustki jest kilkakrotnie wyższe niż u osób niepalących (7, 32, 65, 89, 91). Istotnym czynnikiem jest również alkoholizm. U około 10% uzależnionych tym nałogiem rozwija się przewlekłe zapalenie trzustki, mogące doprowadzić do rozwoju nowotworu tego narządu (25, 39, 55, 61, 64, 90). Prawdopodobieństwo wystąpienia raka trzustki wzrasta 40-krotnie u osób z wrodzonym zapaleniem tego narządu. Nie bez znaczenia pozostaje także wiek pacjentów. Liczne publikacje donoszą o zdiagnozowaniu nowotworu trzustki zarówno u osób młodych, w średnim wieku jak i starszych, jednakże najwyższy odsetek zachorowań odnotowuje się u pacjentów pomiędzy 60 a 80 rokiem życia (18, 47, 73, 94)

Na podstawie licznych badań udowodniono także, iż rakowi trzustki towarzyszą liczne mutacje w genach. Do najczęściej spotykanych należy mutacja genu KRAS, równie często, w 90% przypadków, występuje mutacja genu supresorowego nowotworu CDKN2A (7, 15, 21, 35, 42, 57). 50% zachorowań towarzyszy mutacja genu TP53 (7, 15, 21, 35, 42, 75), w identycznej liczbie przypadków odnotowuje się utratę genu supresorowego nowotworu DPC4 (21, 35, 42, 78, 81, 107), jak również amplifikację genu ERBB2 (40, 44, 78, 81, 86, 107). Rzadziej stwierdza się mutacje genów zaangażowanych w naprawę DNA, takich jak BRCA2 oraz MLH1 (26, 35, 47, 67, 81).

Trzustka w 85% - 90% stanowi gruczoł wydzielania zewnętrznego o budowie pęcherzykowej, produkujący sok trzustkowy zawierający enzymy trawienne. 10% - 15% tego narządu to gruczoł dokrewny, wydzielający między innymi insulinę i glukagon. Utworzony jest on z licznych, drobnych skupisk komórek, zwanych wyspami Langerhansa. Trzustka dorosłego człowieka waży przeciętnie od 70 – 100g. Pod względem budowy anatomicznej składa się ona z trzech części: głowy, trzonu i ogona. Pomiędzy głową a trzonem trzustki znajduje się przewężenie zwane cieśnią. Głowa trzustki objęta jest pętlą dwunastnicy. Powierzchnia tylna trzonu przylega do ściany tylnej żołądka. Ogon trzustki opiera się o śledzionę. Trzustka ma budowę zrazikową. W przeciwieństwie do innych gruczołów nie ma wyraźnej torebki łącznotkankowej. Na przedniej i dolnej powierzchni jest ona pokryta otrzewną, jednakże cały narząd leży pozaotrzewnowo. Pomiędzy zrazikami ilość tkanki łącznej jest niewielka, natomiast na powierzchni trzustki pod otrzewną, jak i pomiędzy zrazikami występują zazwyczaj spore skupienia tkanki tłuszczowej. Trzustka posiada dwa przewody odprowadzające wydzielinę trzustki, zwaną sokiem trzustkowym, do dwunastnicy. Są to przewód trzustkowy oraz przewód trzustkowy dodatkowy. Oba przewody często uchodzą obok siebie w obrębie brodawki większej dwunastnicy na dnie bańki wątrobowo-trzustkowej. W obrębie miąższu trzustki przewody otoczone są zbitą tkanką łączną, tworzącą „szkielet narządu” (66, 84).

Rak trzustki w około 60% - 70% przypadków zlokalizowany jest w głowie trzustki, w 5% - 10% wywodzi się z trzonu trzustki, natomiast w 10% - 15% z ogona. 20% nowotworów tego narządu jest rozprzestrzenionych, obejmując cały gruczoł. Prawie wszystkie zdiagnozowane zmiany są gruczolakorakami wywodzącymi się z nabłonka przewodów. Niektóre mogą wydzielać śluz, wiele cechuje się obfitym, włóknistym zrębem. We wczesnych stadiach nowotwór nacieka otoczenie, a w konsekwencji rozprzestrzenia się na przyległe struktury. W przypadku raków zlokalizowanych w głowie trzustki dochodzi do zajęcia okolic brodawki tego narządu a w konsekwencji do zamknięcia wypływu żółci. U połowy pacjentów z rakiem głowy trzustki następstwem zamknięcia przewodu żółciowego wspólnego jest znaczne rozdęcie rozwidlenia układu przewodów drzewa żółciowego. Raki trzonu i ogona trzustki nie kolidują z przewodami żółciowymi i stąd przez pewien czas pozostają nieme. Mogą niekiedy osiągać

znaczne rozmiary i do czasu zdiagnozowania może nastąpić ich duży rozsiew. W przebiegu raka trzustki najczęściej występują przerzuty do węzłów chłonnych, okolicy wnęki wątroby oraz otrzewnej, rzadziej do skóry. W obrazie mikroskopowym nie występują różnice pomiędzy rakami głowy trzustki a rakami zlokalizowanymi w trzonie oraz ogonie trzustki. Większość rozrasta się tworząc mniej lub bardziej wykształcone struktury gruczołowe. Dodatkowo zaobserwować można wydzielinę śluzową lub nieśluzową. W wielu przypadkach gruczoły są atypowe, nieregularne i małe, wyścielone anaplastycznymi, sześciennymi lub cylindrycznymi komórkami nabłonkowymi. Stwierdzić można również przypadki wzrastające w postaci całkowicie nieodróżnionych struktur. Rak trzustki pozostaje zwykle niemy, dopóki naciek nie obejmuje tkanek miękkich i włókien nerwowych, kiedy to pojawia się ból. Nowotwór jest już wtedy w dużym stopniu zaawansowania i pozostaje poza możliwością leczenia. Do zmian chorobowych mogących pojawić się w trakcie wzrastania guza należy żółtaczkę mechaniczną związaną przeważnie z rakiem głowy trzustki. Jest ona jednak rzadko odpowiednio wcześnie wiązana z toczącym się procesem nowotworowym. Drugim symptomem raka trzustki są spontanicznie pojawiające się zmiany zakrzepowo – zatorowe. Zmiany te powiązane są szczególnie z guzem trzonu i ogona trzustki, nie są one jednak specyficzne dla raka tego narządu (34, 88, 94).

Ze względu na postępujący charakter raka trzustki od dłuższego czasu trwają poszukiwania biochemicznych testów stwierdzających jego obecność. Mimo usilnych starań w dalszym ciągu brak jest specyficznego markera potwierdzającego jednoznacznie występowanie raka trzustki (26, 71, 76, 87, 95, 99).

Obecna diagnostyka bazuje na wynikach badań obrazowych, biochemicznych, histopatologicznych oraz cytologicznych. Wykorzystuje takie techniki jak spiralna tomografia komputerowa, pozytronowa tomografia emisyjna, rezonans magnetyczny i ultrasonografia endoskopowa. Powszechnie stosowane są metody oznaczenia markerów nowotworowych, m.in. CA 19-9 oraz CEA we krwi pacjentów, a także pobieranie materiału do badań cytodagnostycznych za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (20, 48, 56, 72, 85, 99).

Punkcja za pomocą narzędzia podobnego do współczesnej igły aspiracyjnej została po raz pierwszy wykonana w celach terapeutycznych prawdopodobnie około roku 1000. Ponowne doniesienia o użyciu biopsji aspiracyjnej pochodzą z pierwszej połowy XIX wieku (19). Swoją początek zawdzięcza ona metodom cytodiagnostycznym, które dzielimy w zależności od pochodzenia komórek z powierzchni zmiany lub z jej głębi, uwzględniając dodatkowo sposób pobierania materiału do badania, na cytodiagnostykę złuszczeniową, odbitkową i aspiracyjną. W cytodiagnostyce aspiracyjnej podstawę oceny morfologicznej stanowią komórki zaaspirowane z głębi guza lub z narządu (98). Pierwszym doniesieniem XX wieku dotyczącym zastosowania biopsji aspiracyjnej w diagnostyce była praca Greiga i Graya z roku 1904 (28, 98). Wymienieni autorzy posłużyli się nią poszukując czynnika etiologicznego w śpiączce afrykańskiej. Materiał do oceny uzyskiwali z powiększonych węzłów chłonnych. Według Martina i Ellisa o możliwościach stosowania biopsji aspiracyjnej w diagnostyce zmian nowotworowych w węzłach chłonnych wspominał w 1914 roku Ward (19, 59). W 1921 roku Guthrie opisał zastosowanie biopsji aspiracyjnej w ocenie powiększonych węzłów chłonnych (19). Do rutynowej diagnostyki nowotworów biopsja aspiracyjna została wprowadzona w drugiej połowie lat dwudziestych XX wieku przez Martina i Ellisa (59). W swoich publikacjach przedstawili oni technikę uzyskiwania materiału i wykonywania rozmazów, a także szczegółowo omówili wady i zalety metody. Szczególnie podkreślano możliwości szybkiego i pewnego ustalenia rozpoznania morfologicznego w warunkach ambulatoryjnych. Na uwagę zasługuje fakt, iż wprowadzona przez Martina i Ellisa w latach dwudziestych ubiegłego stulecia metoda pobierania materiału z guzów za pomocą nakłucia igłą i aspiracji jest w ogólnych założeniach stosowana do chwili obecnej. Różnicy uległa grubość igieł, te stosowane obecnie są znacznie cieńsze od swoich pierwowzorów (19, 59, 98). Do lat pięćdziesiątych XX wieku BAC nie znalazła szczególnego zastosowania w onkologii. Świadczą o tym nieliczne ukazujące się publikacje. W latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku nastąpił ponowny wzrost zainteresowania cytologią aspiracyjną. Istotny wpływ na jej rozwój miało zastosowanie przez Franzena i wsp. bardzo cienkich igieł oraz strzykawek ze specjalnym uchwytem do przezodbytniczej biopsji gruczołu krokowego (23).

Metoda ta oraz ogólny postęp w cytodiagnostyce przyczyniły się do szerokiego wprowadzenia BAC do onkologii, szczególnie do oceny cytologicznej guzów sutka oraz zmian nowotworowych węzłów chłonnych. Następnie metodę tą z powodzeniem zaczęto stosować w diagnostyce guzów płuc (36, 62, 98). Współcześnie cytodiagnostykę aspiracyjną stosuje się w ocenie zmian wielu narządów i tkanek.

Do zaaspirowania materiału komórkowego używa się obecnie bardzo cienkich igieł o średnicy poniżej 1mm, stąd metodę pobierania materiału do badania cytologicznego określa się mianem biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC). Nakłucie cienką igłą jest niemal bezbolesne, stąd sposób pobierania materiału jest określany jako atraumatyczny. W czasie wykonywania BAC do światła igły dostaje się kropla płynu, będąca zawiesiną komórek. Z tego płynu wykonuje się rozmazy cytologiczne. BAC pozwala na uzyskiwanie materiału do oceny morfologicznej także z głęboko położonych guzów bez konieczności wykonywania zabiegu operacyjnego. Może być ona wykonywana w warunkach ambulatoryjnych. W razie potrzeby wynik badania można uzyskać w 10 – 15min po punkcji. Analiza rozmazu pozwala zwykle na odróżnienie guzów złośliwych od łagodnych, często umożliwia dokładne określenie typu histologicznego nowotworu lub też stopnia jego zróżnicowania. Używając cienkich igieł wyeliminowano powikłania jakie czasem miały miejsce po punkcji z użyciem grubszych igieł. Umożliwiło to z kolei rozszerzenie zakresu zastosowania tej metody. Wskazaniem do BAC może być obecnie niemal każda zmiana chorobowa stwierdzana badaniem palpacyjnym, radiologicznym, scyntygraficznym, czy też innym, niezależnie od jej umiejscowienia (59, 98).

Na przestrzeni ostatnich lat zaczęto z powodzeniem stosować biopsję aspiracyjną cienkoigłową w diagnostyce guzów trzustki. Materiał pobrany w ten sposób pozwala na szybkie uzyskanie diagnozy, dlatego też metoda ta znalazła również zastosowanie w badaniu śródoperacyjnym tego narządu (3, 16, 17, 48, 54, 100).

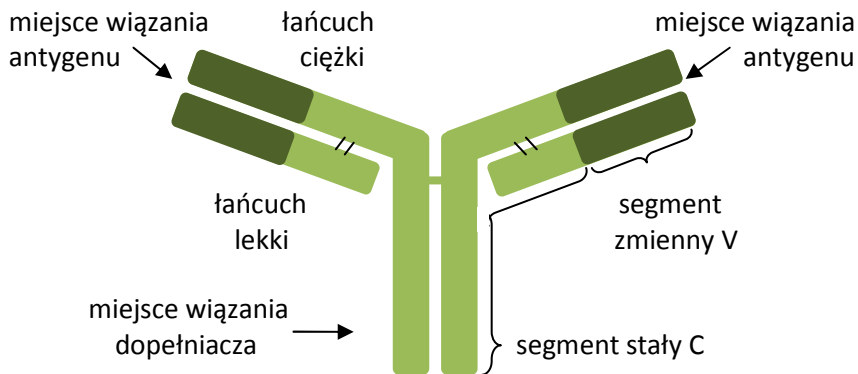
Inną metodą stosowaną w diagnostyce zmian patologicznych jest oznaczanie markerów nowotworowych. Są to wielocząsteczkowe substancje obecne we krwi, moczu lub w wycinkach tkanek pobranych od pacjenta, których obecność lub podwyższone stężenie wskazuje na toczący się proces nowotworowy. Markery nowotworowe odzwierciedlają trzy zjawiska zachodzące

w nowotworze: proliferację komórek nowotworowych, różnicowanie komórek nowotworowych oraz ich obumieranie. Markery nowotworowe mogą mieć charakter antygenów, białek, enzymów, hormonów, mutacji genów lub substancji związanych z powierzchnią komórek nowotworowych. Antygeny nowotworowe mogą być wykorzystane do wykrywania i diagnozowania nowotworów za pomocą skierowanych przeciw nim przeciwciał. Mogą one występować nie tylko na komórkach określonego nowotworu bądź grupy nowotworów, ale też na komórkach nienowotworowych. Mogą to być swoiste unikatowe antygeny nowotworowe (TSA) lub antygeny występujące w niewielkich ilościach w niektórych komórkach prawidłowych, tzw. antygeny związane z nowotworem (TAA) (13, 43).

Antygeny są to wielkocząsteczkowe związki, które wprowadzone do ustroju powodują reakcję immunologiczną oraz mają zdolność wiązania się ze swoistym przeciwciałem. Przeciwciała to wysoce specyficzne białka należące do klasy immunoglobulin, które produkowane są w odpowiedzi na specyficzne antygeny. Mają one zdolność swoistego wiązania się z określoną determinantą antygenową. Przeciwciało jest cząsteczką o kształcie litery Y, w której oba ramiona Y są odcinkami wiążącymi antygen. W efekcie powstaje kompleks antygen – przeciwciało. Ogonek Y odpowiada za aktywację białek dopełniacza i pobudzenie fagocytów. Cząsteczka przeciwciała zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: pary identycznych łańcuchów ciężkich połączonych z parą identycznych łańcuchów lekkich. Każdy łańcuch lekki zbudowany jest z około 214 aminokwasów, a każdy łańcuch ciężki z ponad 400 aminokwasów. Łańcuchy polipeptydowe są połączone, a mostki dwusiarczkowe i wiązania niekowalencyjne utrzymują stabilność ich konfiguracji. Każdy łańcuch zawiera segment stały i segment zmienny. W segmencie stałym, inaczej zwanym segmentem lub regionem C, sekwencja aminokwasów jest stała i charakterystyczna dla każdej z pięciu klas immunoglobulin. Sekwencja aminokwasów w regionie V jest zmienna. Segment V jest fragmentem cząsteczki przeciwciała determinującym swoiste wiązanie antygeny (8, 12). W zależności od struktury wyróżnia się 5 klas immunoglobulin: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Każda z nich charakteryzuje się specyficzną sekwencją aminokwasów w segmencie stałym ciężkiego łańcucha polipeptydowego, który jednocześnie

warunkuje rodzaj funkcji spełnianych przez poszczególne klasy immunoglobulin (8, 12).

Ryc. 1: Budowa immunoglobulin.



We współczesnej diagnostyce nowotworów trzustki stosuje się między innymi oznaczanie we krwi pacjenta stężenia antygenów CA 19-9 oraz CEA, będących markerami nowotworowymi. Przedmiotem moich badań stał się antygen CA 19-9 występujący także pod nazwą GICA (gastrointestinal carcinoma-associated antygen). Stanowi on sialowaną pochodną antygeny typu Levis'a, jest najprawdopodobniej produktem genu odpowiedzialnego za syntezę tej substancji grupowej. CA 19-9 to glikoproteina o wysokiej masie cząsteczkowej, będąca połączeniem mucyny z determinantą węglowodanową. Wiąże się ona z przeciwciałem monoklonalnym 1116NS 19.9, odkrytym przez Koprowskiego i wsp. w 1979 roku (6, 69). Antygen ten może wchodzić w skład glikolipidów błony komórki nowotworowej jako monosialogangliozyd lub może być wydzielany do krwi jako glikoproteina o wysokiej masie cząsteczkowej, która należy do frakcji mucynowej. Pojawienie się zwiększonych ilości CA 19-9 w komórce nowotworowej jest prawdopodobnie wynikiem odblokowania syntezy złożonych struktur węglowodanowych wywołanej aktywacją normalnie nieczynnych transferaz glikozydowych. CA 19-9 jest obecny w komórkach nabłonkowych trzustki, żołądka, wątroby, pęcherzyka żółciowego okrężnicy i płuc. Stężenie tego antygeny wzrasta w nowotworowych i nienowotworowych zmianach tych tkanek. Antygeny CA 19-9 nie wykryto natomiast w prawidłowej

tkance jelita osób dorosłych ani w śluzówce otaczającej zmiany rakowe. GICA nie występuje u ludzi z grupą krwi Lewisa b (6, 12, 43, 69, 87, 96).

Wynik biopsji aspiracyjnej trzustki w połączeniu z technikami obrazowania oraz wynikami oznaczeń biochemicznych we krwi pacjenta markerów nowotworowych CA 19-9 oraz CEA może dać potwierdzenie lub zaprzeczenie toczącego się procesu nowotworowego (6, 30, 34, 42, 76, 94). Analiza wyników powyższych badań często nie pozostaje bez wątpliwości (4, 11), a moment postawienia rozpoznania nowotworu trzustki wiąże się z regułą ze znacznym stopniem jego zaawansowania (51). W dostępnym piśmiennictwie nie ma jednak informacji na temat zastosowania markera CA 19-9 na materiale pobranym z trzustki za pomocą BAC z wykorzystaniem technik immunocytochemicznych (ICC). Zagadnienie to stało się przedmiotem moich dalszych badań.

2. CEL PRACY

Z przedstawionych we wstępie informacji wynika, że częstość zachorowań na raka trzustki nie zmienia się od ponad pół wieku i utrzymuje na wysokim poziomie. Jednocześnie symptomy toczącego się procesu nowotworowego uwiadcniają się dopiero w stadium zaawansowanej choroby. Uzasadnionym staje się więc szukanie metody diagnostycznej, która pozwoli na wczesne wykrycie powstających zmian patologicznych w tym narządzie.

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie zastosowaniem biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej do pobierania i oceny materiału pochodzącego z trzustki (100). Również oznaczanie markerów nowotworowych CA 19-9 oraz CEA we krwi pacjenta jest ważnym elementem procesu diagnostycznego. Badania z wykorzystaniem tych metod niejednokrotnie zostały opublikowane. Wśród tych doniesień nie ma jednak informacji na temat oznaczania antygenu CA 19-9 z wykorzystaniem metod immunocytochemicznych na materiale pobranym z trzustki w trakcie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej.

Szczegółowymi celami niniejszej rozprawy doktorskiej są:

1. Ocena przydatności badania immunocytochemicznego ekspresji CA 19-9 w rozmazach pobranych w trakcie BAC trzustki.
2. Porównanie wyników badania immunocytochemicznego CA 19-9 z wynikami badania cytologicznego oraz w razie niejednoznacznych rezultatów z wynikami badania histologicznego, a także opisami zabiegów operacyjnych.
3. Konfrontacja otrzymanych rezultatów z efektami prac innych naukowców dotyczących badanego zagadnienia.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Do badań retrospektywnych użyto preparatów barwionych metodą H+E lub MGG, sporządzonych w trakcie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej trzustki. Materiał pobierany był śródoperacyjnie od pacjentów Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 1999 – 2010 (kierownik: prof. dr hab. Michał Drews). Wiek pacjentów wynosił od 26 do 81 lat. Całkowita liczba badań wynosiła 197, w tym 80 kobiet i 117 mężczyzn. Na podstawie wyników badania cytologicznego dokonano podziału materiału na 6 grup (Tabela 1). Do celów badawczych wybrano łącznie 156 badań, których wynik jednoznacznie wskazywał na występowanie komórek nowotworowych (55 badań), jak również grupę z wynikami diagnozującymi toczący się proces zapalny (30 badań), wynikami wątpliwymi (29 badań) oraz grupę z komórkami prawidłowymi trzustki (42 badania). Po zakończeniu etapu badawczego związanego z przeprowadzeniem reakcji immunocytochemicznej na preparatach cytologicznych 42 otrzymane wyniki wymagały dalszego potwierdzenia. W tym celu użyto archiwalnych preparatów histopatologicznych wybarwionych metodą H+E. Materiał ten pochodził z trzustki (18 przypadków), węzłów chłonnych (7 przypadków), pęcherzyka żółciowego (3 przypadki), błony śluzowej żołądka (2 przypadki), wątroby (1 przypadek), odbytnicy (1 przypadek) i tkanki tłuszczowej okołotrzustkowej (1 przypadek). W pozostałych 9 przypadkach nie pobrano materiału do badań histopatologicznych.

W 14 przypadkach w materiale histopatologicznym oznaczono także marker nowotworowy CA 19-9

Jako kontrolę pozytywną do badań immunocytochemicznych oraz immunohistochemicznych zastosowano preparaty ze skrawkami guza jelita grubego.

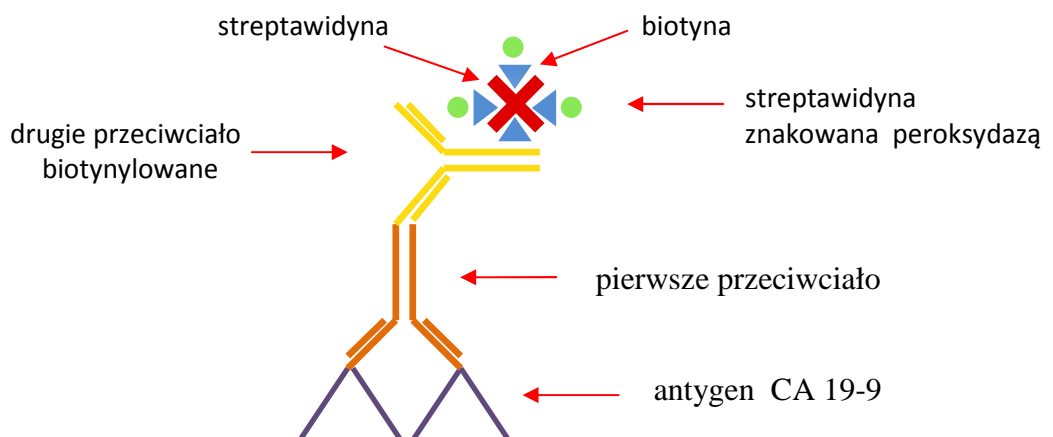
Na wykonanie badań uzyskano pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2. Metody

Preparaty cytologiczne sporządzono z materiału pobranego od pacjentów śródoperacyjnie za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Do tego celu użyto zestawu składającego się z uchwytu, strzykawki oraz igły o średnicy poniżej 1mm. Zaaspirowany materiał nastrzyknięto na szkiełka podstawowe, wykonano rozmaz i utrwalono w alkoholu 96%. Następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną, poddano ocenie w mikroskopie świetlnym firmy Zeiss oraz wykonano dokumentację fotograficzną.

W kolejnym etapie preparaty cytologiczne odbarwiono w alkoholu kwaśnym i poddano reakcji immunocytochemicznej wykorzystując technikę opartą na metodzie LSAB.

Ryc. 2: Reakcja immunocytochemiczna wykorzystująca metodę LSAB (8).



Preparaty zanurzone w alkoholu 96% na okres 2 minut, następnie płukano w wodzie destylowanej 10 minut i przełożono do TBS na 10 minut. Po upływie tego czasu pokryto preparaty 3% roztworem nadtlenku wodoru w celu zablokowania endogennej peroksydazy i ponownie wypłukano w wodzie destylowanej. Następnie preparaty przeniesiono do komory wilgotnej, przepłukano TBS-em i osuszono. W kolejnym etapie nałożono pierwotne przeciwciało anti - CA 19-9 w rozcieńczeniu 1:100, ustalonym w trakcie prób poprzedzających doświadczenie na materiale badanym. Inkubację prowadzono

w temperaturze pokojowej przez okres 45 minut. Następnie ponownie przepłukano preparaty TBS-em i osuszono. Nałożono drugie przeciwciało biotynylowane i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Powtórzono czynności płukania i osuszania preparatów. Nałożono streptawidynę znakowaną peroksydazą, inkubowano w temperaturze pokojowej przez pół godziny. Ponownie powtórzono czynności płukania i osuszania. Na preparaty nakropiono DAB, inkubowano 1 minutę, spłukano DAB i przełożono do płuczki z TBS-em, następnie płukano wodą destylowaną przez okres 10 minut, barwiono hematoksyliną Mayera 5 minut i przepłukano wodą destylowaną. Preparaty przeprowadzono przez szereg wzrastających stężeń alkoholi, zamknięto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą balsamu kanadyjskiego, poddano ocenie w mikroskopie świetlnym i wykonano dokumentację fotograficzną.

Równocześnie z materiałem badanym przeprowadzono kontrolę dodatnią z użyciem materiału pobranego z guza jelita grubego. Preparat kontrolny poddany był identycznej obróbce immunohistochemicznej jak materiały badane.

Preparaty histopatologiczne użyte w celu potwierdzenia wyników uzyskanych po przeprowadzeniu reakcji ICC na preparatach cytologicznych sporządzone zostały z materiału pobranego od pacjentów w trakcie zabiegów operacyjnych. Materiał po pobraniu zanurzano w formalinie buforowanej w stosunku 1:10 na 24 godziny, następnie płukano, wykrawano, umieszczano w kasetkach histopatologicznych i odwadniano poprzez przeprowadzenie przez szereg wzrastających stężeń alkoholi oraz przeprowadzono przez płyny pośrednie. Następnie tkanki zatapiano w parafinie i krojono na mikrotomie. Uzyskane w ten sposób skrawki o grubości 4 μm nanoszono na szkiełka podstawowe, odparafinowywano, barwiono hematoksyliną oraz eozyną i poddawano ocenie w mikroskopie świetlnym.

Skrawki przeznaczone do oznaczenia antygenu Ca 19-9 oraz preparat kontrolny sporządzony ze skrawków guza jelita grubego nanoszono na szkiełka pokryte substancją antypoślizgową i gotowano w celu odkrycia antygenów. Następnie przeprowadzono reakcję immunohistochemiczną analogicznie jak w przypadku reakcji immunocytochemicznej w preparatach cytologicznych.

Dokumentację fotograficzną wykonano wykorzystując dwa urządzenia.

1. Skaner DotSlide (firmy Olympus). Preparaty były rejestrowane przy powiększeniu od 10x do 40x oraz przy wysokiej rozdzielczości. Skanowane preparaty były zapisywane w standardowym formacie oprogramowania DotSlide – VSI. Uzyskane cyfrowe preparaty poddawano dalszej obróbce wykorzystując oprogramowanie OlyVIA (firmy Olympus). Proces ten polegał na wyodrębnieniu z każdego wirtualnego preparatu podobrazów pod powiększeniem od 10-krotnego do 40-krotnego, zależnie od potrzeb. Ostatecznie pozwoliło to na uzyskanie powiększeń od 100 do 1600-krotnego. Następnie każdy podobraz zapisywany był w formacie JPG.
2. Aparat fotograficzny firmy Olympus model DP12. Zdjęcia wykonywane były pod powiększeniem od 100 do 400 krotnego w zależności od potrzeb, a następnie zapisywane w formacie JPG.

Źródło odczynników

Przeciwciało mouse anti-CA 19-9, clone 116-NS-19-9 zostało zakupione w firmie Life Technologies Polska sp. z o.o.. Zestaw LSAB PLUS/HRP-RB/MO/GT 1100 oraz szkiełka podstawowe SuperFrost® zakupiono w firmie DAKO POLSKA sp. z o.o.. Odczynnik Buffers IHC diluent zakupiono w firmie BLOKOM s.c.. Ksylen, Tris, naważki HCl oraz balsam kanadyjski zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.. Sodu chlorek cz.d.a. oraz formaldehyd zakupiono w firmie CHEMED sp. z o.o.. Hematoksylinę wg Mayera, eozynę wodną oraz parafinę zakupiono w firmie Aqua-Med ZPAM-KOLASA sp.j. Wodoru nadtlenuk 30% cz.d.a. zakupiono w firmie CHEMPUR. Etylowy alkohol 96% oraz 99,8% zakupiono w firmie Akwawit – Brasco S.A.. Szkiełka nakrywkowe zakupiono w firmie Haimen Changlong Instrument Co., Ltd.

4. Wyniki

4.1. Preparaty cytologiczne, archiwalne, wykonane z materiału pobranego z trzustki metodą BAC, wybarwione hematoksyliną i eozyną.

Analizie poddano 1351 preparatów wykonanych z materiału pobranego od 197 pacjentów. Na podstawie uzyskanych wyników badane aspiraty podzielono na VI grup opisanych poniżej w tabeli.

Tabela 1: Podział przypadków ze względu na wynik badania cytologicznego biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej materiału pobranego z trzustki. Preparaty barwione hematoksyliną i eozyną.

Numer grupy	Wynik badania cytologicznego materiału pobranego za pomocą BAC i wybarwionego metodą H+E	Liczba przypadków
Grupa I	Wynik badania stwierdzający występowanie komórek nowotworowych	55
Grupa II	Wynik badania stwierdzający proces zapalny	30
Grupa III	Wynik badania wątpliwy	29
Grupa IV	Wynik badania stwierdzający występowanie prawidłowych komórek trzustki	42
Grupa V	Torbiele trzustki	7
Grupa VI	Badania niediagnostyczne	34

Grupę I (55 przypadków) stanowiły preparaty, w których zaobserwowano znaczną atypię komórkową. Dominował polimorfizm, komórki gruczołowe przyjmowały kształt okrągły, cylindryczny, sześcienny, nieregularny, tworząc układy pęcherzykowe. Stosunek jądra do cytoplazmy był przesunięty na korzyść jądra. Zaobserwowano jądra komórkowe różnej wielkości i kształtu, w których wyraźnie zaznaczona była chromatyna oraz duże, widoczne jąderka. Chromatyna rozmieszczona była nierównomiernie, ogniskowo. W ocenianych preparatach widoczne były także komórki dwu- i wielojądrowe. W cytoplazmie komórek nowotworowych występowały wodniczki (fot. 6, 8, 10, 14).

Do grupy II (30 przypadków) zaliczono preparaty, których obraz jednoznacznie potwierdzał toczący się proces zapalny. Uwagę zwracały licznie występujące granulocyty obojętnochłonne oraz limfocyty a także makrofagi. Wśród normotypowych komórek gruczołowych trzustki widoczne były także komórki posiadające stosunkowo duże jądra z widocznymi jąderkami, leżące pojedynczo lub w grupach (fot. 16, 18, 20, 23).

Preparaty, w których postawienie jednoznacznej diagnozy ze względu na niewielką liczbę komórek atypowych lub jednocześnie występujące wykładniki procesu zapalnego i nowotworowego było niemożliwe zakwalifikowano do grupy III (29 przypadków). Analizowany materiał tej grupy zawierał prawidłowe skupiska komórek gruczołowych trzustki, pojedyncze komórki z cechami atypii, jak również komórki gruczołowe bez cech atypii w układach mikropęcherzykowych z dużymi jąderkami. Obserwowano także komórki trzustki z powiększonymi, hiperchromatycznymi jądrami oraz pojedyncze płyty komórek o wzmożonej aktywności mitotycznej. W większości przypadków odnotowywano także komórki nacieku zapalnego, zwłaszcza granulocyty obojętnochłonne i limfocyty (fot. 27, 29, 31, 35, 39, 43, 47).

Kolejną, IV grupę (42 przypadki) stanowiły preparaty, w których występowały prawidłowe płyty i grupy komórek nabłonka gruczołowego trzustki bez cech atypii (fot. 51).

Badania, w których zdiagnozowano torbiele trzustki (grupa V, 7 przypadków) oraz których materiał ze względu na autolizę lub brak komórek nabłonka gruczołowego trzustki zakwalifikowano jako niediagnostyczny (grupa VI, 34 przypadki) nie zostały poddane analizie w dalszym postępowaniu.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano po jednym preparacie z każdego analizowanego przypadku. O wyborze decydowała ilość oraz jakość materiału naniesionego na dane szkiełko mikroskopowe.

4.2. Preparaty cytologiczne, odbarwione, w których została przeprowadzona reakcja immunocytochemiczna.

Kontrola pozytywna dla badań ICC oraz IHC.

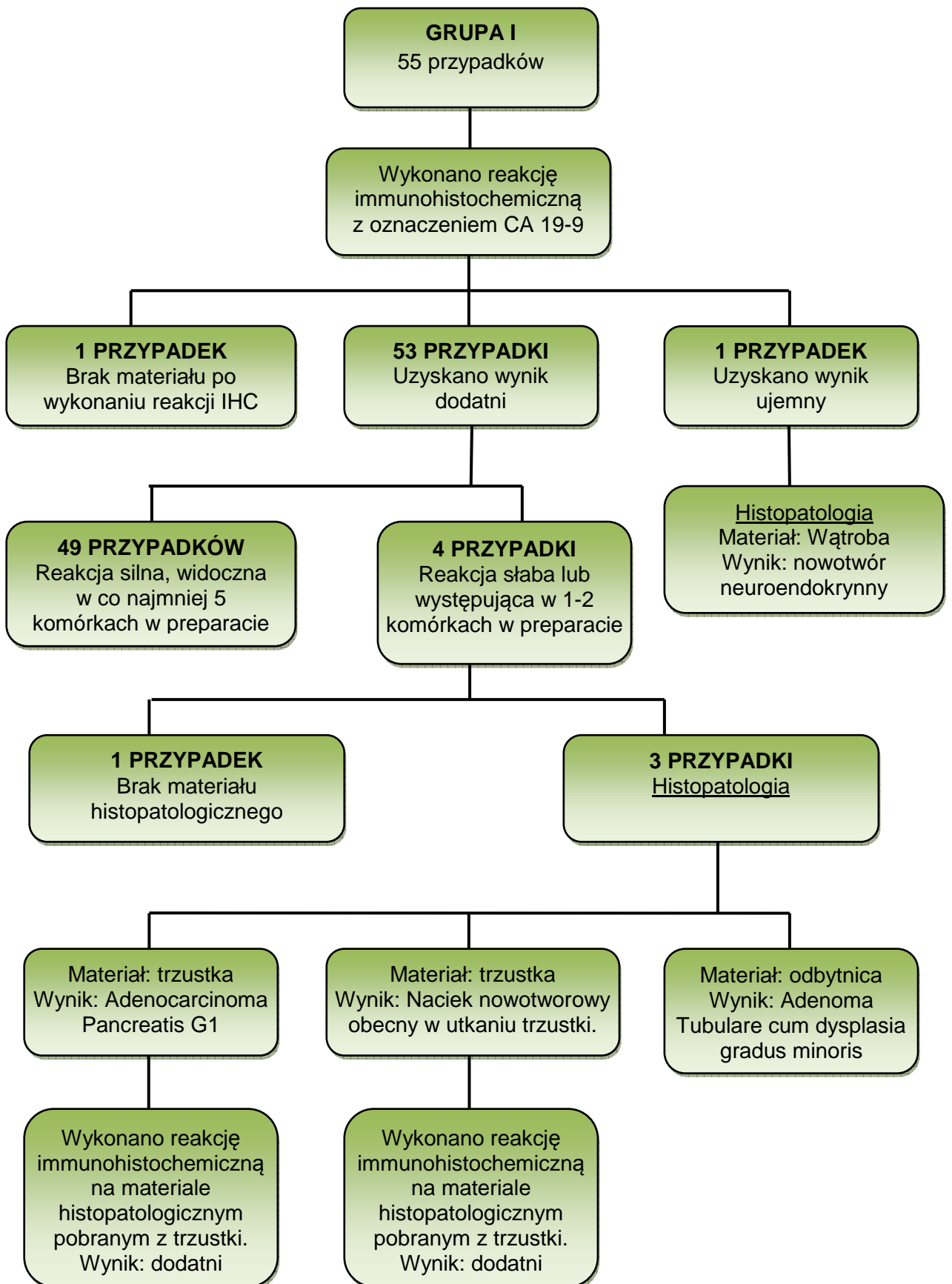
Kontrolę pozytywną stanowiło 14 preparatów sporządzonych ze skrawków guza jelita grubego. W każdym z nich wynik reakcji immunohistochemicznej, w której oznaczano antygen CA 19-9 był pozytywny oraz bardzo wyraźny (fot.1).

Grupa badana.

Reakcji immunocytochemicznej poddano 156 preparatów cytologicznych zakwalifikowanych w pierwszym etapie badań do grup I – IV.

W grupie pierwszej, w której jednoznacznie zdiagnozowano występowanie komórek nowotworowych, analizowano 55 preparatów. Otrzymane rezultaty reakcji antygen przeciwciało uwidacznia schemat 1. Po przeprowadzeniu reakcji immunocytochemicznej odrzucono jeden preparat z powodu spłynięcia materiału. Rezultaty otrzymane w pozostałych 54 materiałach prezentowały się następująco: wynik ujemny uzyskano w 1 preparacie (fot. 2, 3), wynik dodatni w 53 preparatach. Brak reakcji antygen-przeciwciało uzyskany w jednym badaniu potwierdził rozpoznanie postawione po przeprowadzeniu analizy preparatów cytologicznych tego przypadku barwionych metodą H+E. Stwierdzono w nim występowanie w aspiratach z trzustki komórek nowotworu neuroendokrynnego. W celu potwierdzenia rozpoznania immunocytochemicznego obejrzano materiał histopatologiczny danego pacjenta pobrany z wątroby, w którym także stwierdzono obecność nowotworu neuroendokrynnego (fot. 4). Rozpoznanie to potwierdzono poprzez wykonanie reakcji immunohistochemicznej polegającej na oznaczeniu w badanym materiale neuroendokrynnego białka wydzielniczego – chromograniny A (fot. 5). Pozytywne wyniki reakcji immunohistochemicznej podzielono na 2 podgrupy. Pierwszą stanowiło 49 przypadków, w których reakcja ICC dała silny efekt dodatni, widoczny co najmniej w pięciu komórkach w postaci brązowego wybarwienia błon komórkowych. Rezultat ten nie pozostawiał wątpliwości i jednoznacznie potwierdził występowanie w materiale badanym komórek

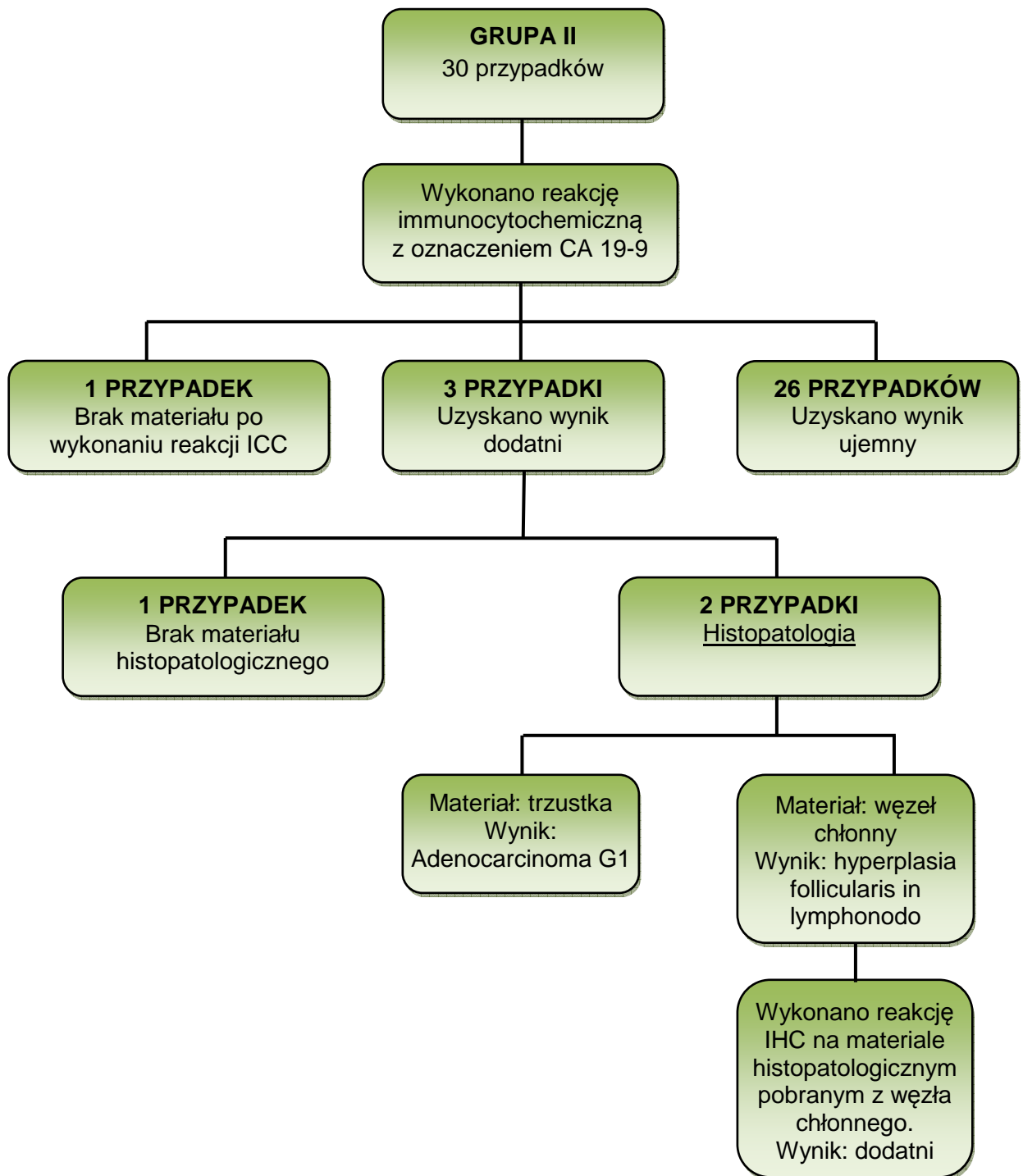
Schemat 1: Wyniki uzyskane w grupie I.



nowotworowych trzustki (fot. 6, 7). Drugą podgrupę stanowiły 4 przypadki, w których końcowy efekt reakcji był słabo widoczny lub występował w 1 – 2 komórkach. Z pośród tych badań w jednym przypadku nie dysponowano żadnym materiałem porównawczym. Odwołując się jednak do opisu zabiegu operacyjnego danego pacjenta, w którym odnotowano widoczny, duży, nieoperacyjny guz głowy trzustki, można przypuszczać, iż słaba reakcja immunocytochemiczna potwierdzała proces nowotworowy (fot. 8, 9). Przypadek ten nie został jednak ostatecznie potwierdzony. Trzy pozostałe przypadki porównano z materiałem histopatologicznym. Dwa z nich pochodziły z trzustki i jednoznacznie potwierdziły obecność nowotworu zarówno w preparatach barwionych metodą H+E jak i po wykonaniu reakcji immunohistochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9 (fot. 10, 11, 12, 13). Trzeci materiał pobrany był z odbytnicy. Wynik wykonanej w tym materiale reakcji immunohistochemicznej mimo, iż był dodatni nie stanowił wartości diagnostycznej, ponieważ u wyżej wymienionego pacjenta rozpoznano nowotwór łagodny: gruczolaka cewkowego. Również w tym przypadku konieczne było odwołanie się do zapisów operacyjnych, w których zanotowano widoczny guz głowy trzustki naciekający dwunastnicę. Analogicznie do omówionego powyżej przypadku można przypuszczać, że otrzymany rezultat potwierdzał obecność zmiany nowotworowej, ostateczne potwierdzenie tego wyniku było jednak niemożliwe (fot. 14, 15).

Drugą grupę stanowiły badania, w których stwierdzono toczący się proces zapalny (schemat 2). Analizowano 30 przypadków poddanych reakcji immunocytochemicznej. W rezultacie uzyskano 26 wyników ujemnych potwierdzających rozpoznanie cytologiczne (fot. 16, 17) oraz trzy wyniki dodatnie, sugerujące występowanie w badanym materiale komórek nowotworowych trzustki. W jednym przypadku w trakcie wykonywania badań materiał spłynął ze szkiełka mikroskopowego. Trzy rezultaty pozytywne poddano dalszej analizie. W jednym przypadku ze względu na brak materiału porównawczego odwołano się do opisu zabiegu operacyjnego. Stwierdzono w nim nieoperacyjny, lity guz głowy trzustki. Wynik ten może potwierdzać otrzymany rezultat reakcji IHC, jednak nie stanowi ostatecznego rozpoznania (fot. 18, 19). Dwa pozostałe wyniki porównano z wynikami analizy preparatów histopatologicznych. W pierwszym przypadku dysponowano wynikiem badania

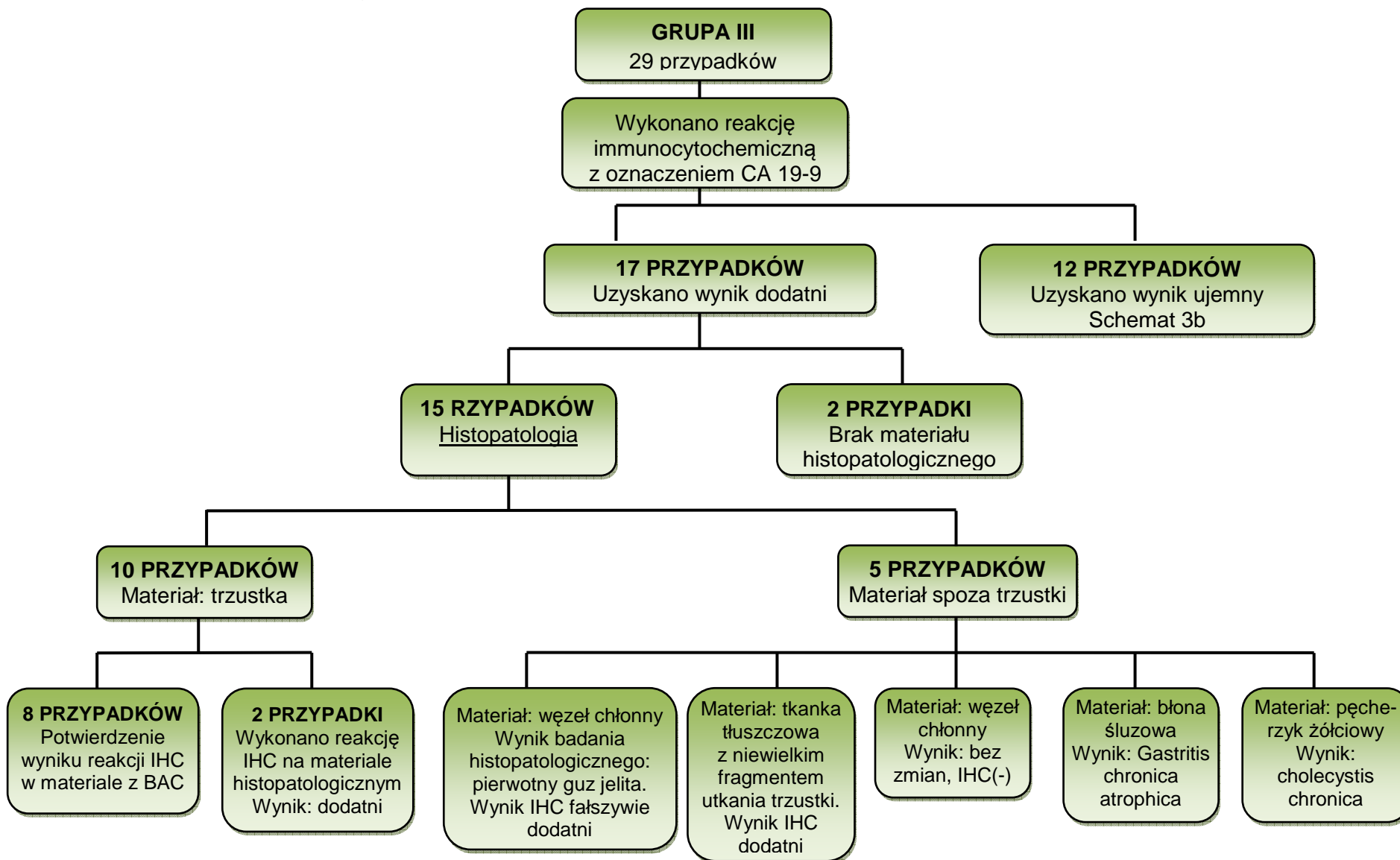
Schemat 2: Wyniki uzyskane w grupie II.



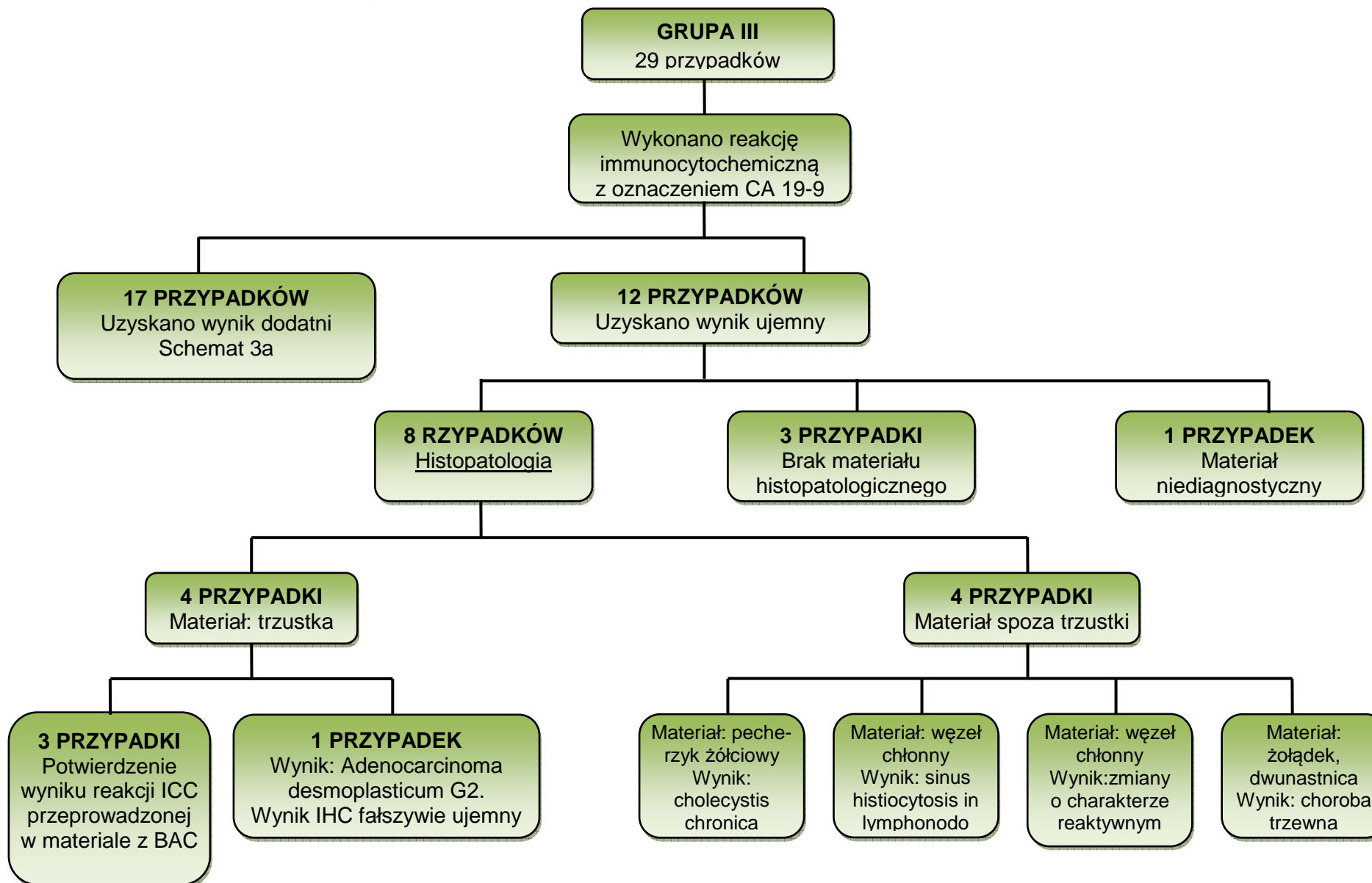
śródooperacyjnego trzustki, który jednoznacznie potwierdzał obecność nowotworu (fot. 20, 21, 22). W drugim przypadku materiał histopatologiczny stanowił węzeł chłonny okołotrzustkowy. Wynik oceny preparatu barwionego metodą H+E stwierdzał rozrost grudkowy węzła chłonnego. W analizowanym materiale przeprowadzono reakcję IHC, za pomocą której oznaczono antygen CA 19-9. Rezultat reakcji był dodatni, retrospektywna analiza mikroskopowa ujawniła ogniska mikroprzerzutów widoczne w utkaniu węzła chłonnego. Przeprowadzony proces diagnostyczny potwierdził otrzymany wynik reakcji ICC w materiale cytologicznym (fot. 23, 24, 25, 26).

Kolejną grupę stanowiło 29 przypadków, których wynik badania cytologicznego był niejednoznaczny. Po oznaczeniu antygeny CA 19-9 w analizowanym materiale otrzymano 17 wyników dodatnich reakcji ICC (schemat 3a) oraz 12 rezultatów ujemnych (schemat 3b). W podgrupie pierwszej, w której wynik ICC był dodatni dwa z siedemnastu badań ze względu na brak materiału porównawczego nie były poddane dalszej diagnostyce. Opis zabiegu operacyjnego potwierdził jednak widoczny guz głowy trzustki w obydwu przypadkach, co może sugerować, iż otrzymany rezultat reakcji ICC był prawidłowy (fot. 27, 28). W pozostałych piętnastu badaniach wynik ICC porównano z materiałem histopatologicznym. W 10 przypadkach pochodził on z trzustki, z czego w 8 przypadkach rozpoznanie histopatologiczne jednoznacznie potwierdziło wynik reakcji antygen – przeciwciała przeprowadzonej na materiale cytologicznym (fot. 29, 30). W dwóch przypadkach konieczne było oznaczenie antygeny CA 19-9 w materiale histopatologicznym, które także ostatecznie potwierdziło wynik immunocytochemiczny otrzymany w materiale cytologicznym (fot. 31, 32, 33, 34). 5 ostatnich wyników z podgrupy pierwszej porównano z materiałem histopatologicznym spoza trzustki. Pierwszy materiał pochodził z okołotrzustkowego węzła chłonnego. Stwierdzono w nim nacieki nowotworowe będący prawdopodobnie guzami pierwotnymi jelita. W świetle tej diagnozy otrzymany wynik dodatni reakcji ICC w materiale cytologicznym może być uważany za fałszywie dodatni. Warto jednak rozważyć, iż antygen CA 19-9 może występować na powierzchni komórek nowotworowych całego układu pokarmowego, nie tylko trzustki. W tym aspekcie reakcja dodatnia zaobserwowana w materiale zaaspirowanym metodą biopsji aspiracyjnej

Schemat 3a: Wyniki uzyskane w grupie III.



Schemat 3b: Wyniki uzyskane w grupie III.



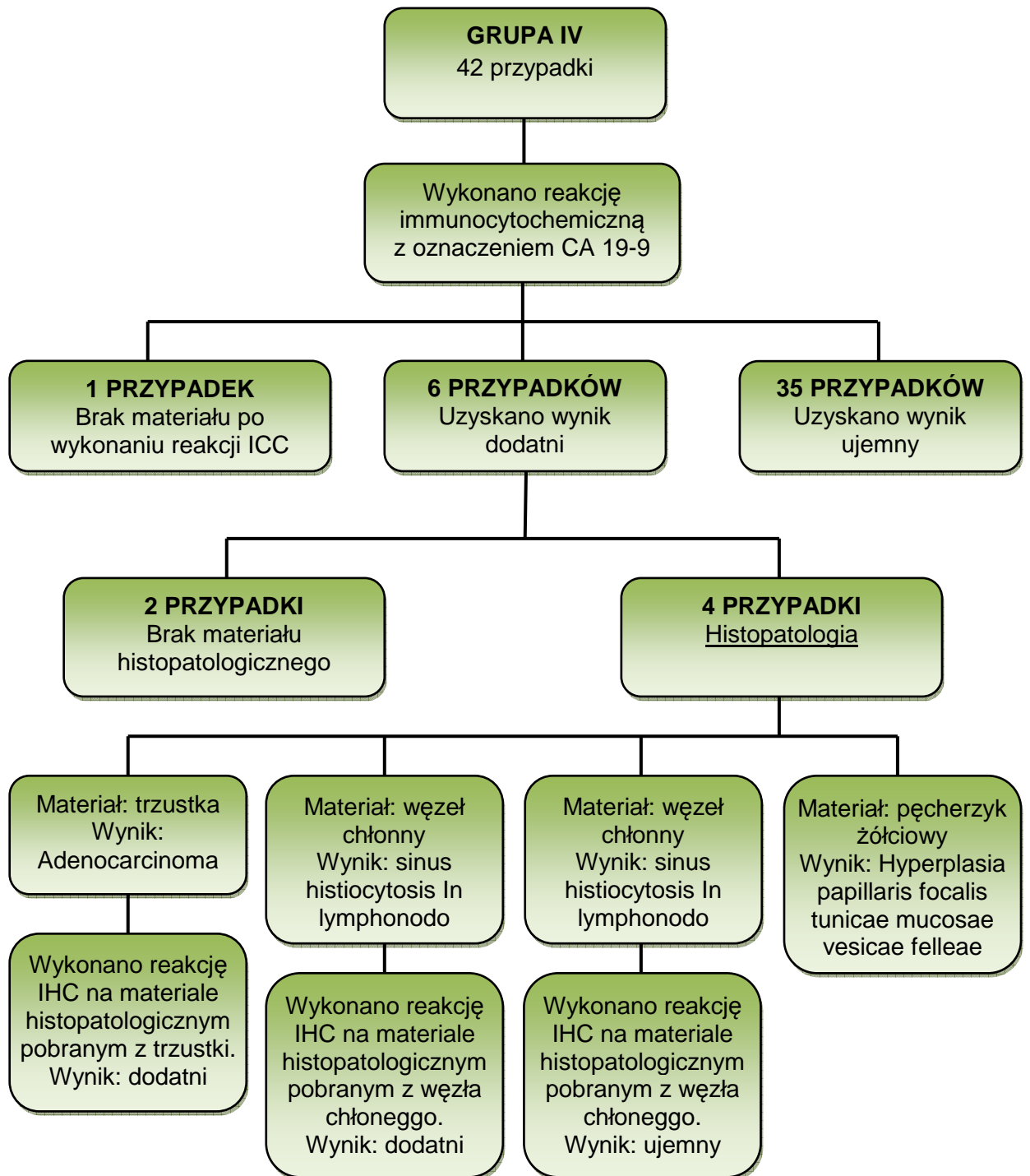
cienkoigłowej ze zmiany występującej w węźle chłonny a będącej przerzutem z guza jelita jest jak najbardziej prawidłowa (fot. 35, 36, 37, 38). Kolejny materiał stanowiła tkanka tłuszczowa pobrana z okolic trzustki, w której zdiagnozowano martwicę balserowską oraz niewielkie fragmenty tego narządu. Po oznaczeniu w pobranym materiale antygenu CA 19-9 za pomocą reakcji IHC uzyskano wynik dodatni, który jednoznacznie potwierdził rezultat uzyskany w aspiratach z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (fot. 39, 40, 41, 42). Do potwierdzenia kolejnego wyniku reakcji ICC w materiale cytologicznym użyto materiału pochodzącego z węzła chłonnego. Wynik histopatologiczny tego badania stwierdzał brak zmian przerzutowych. Po wykonaniu reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9 uzyskano wynik ujemny, potwierdzający rozpoznanie histopatologiczne. Ponieważ nie dysponowano materiałem pochodzącym z trzustki uzyskany wynik wykluczył jedynie zmiany o charakterze przerzutowym. Odwołano się więc do zapisów operacyjnych, w których stwierdzono, że cała trzustka była powiększona, a w obrębie głowy narządu występował naciek obejmujący także dwunastnicę. Informacje te sugerują, że wynik reakcji ICC był prawidłowy, nie mogą one jednak decydować o ostatecznym rozpoznaniu (fot. 43, 44, 45, 46). W czwartym z pięciu przypadków do porównania wyniku ICC dysponowano jedynie materiałem pobranym z błony śluzowej żołądka. Materiał ten nie miał wartości porównawczej. Odwołano się więc do zapisów z przeprowadzonej operacji, w których odnotowano widoczny guz głowy trzustki. Zapis ten może sugerować, iż dodatni wynik reakcji antygen – przeciwciało uzyskany na materiale cytologicznym był prawidłowy, nie stanowi on jednak ostatecznego potwierdzenia otrzymanego rezultatu. Ostatni przypadek z grupy III, w którym po przeprowadzeniu reakcji ICC uzyskano wynik dodatni nie został potwierdzony. Materiał porównawczy jakim dysponowano pochodził z pęcherzyka żółciowego, w którym antygen CA 19-9 występuje swoiście i jego oznaczenie nie stanowi wartości diagnostycznej. Nie dysponowano również zapisami z przebiegu operacji.

Podgrupę drugą stanowiło 12 preparatów, w których uzyskano ujemny wynik reakcji ICC w materiale cytologicznym. Z pośród nich w jednym preparacie stwierdzono bardzo skąpą ilość materiału. Preparat ten został uznany za niediagnostyczny. W trzech przypadkach nie dysponowano materiałem

histopatologicznym, który umożliwiłby potwierdzenie otrzymanych rezultatów, jednakże opisy zabiegów stwierdzały brak obecności guza w utkaniu trzustki. Zapisy te mogą stanowić podstawę do uznania wyników otrzymanych po przeprowadzeniu reakcji ICC w materiale cytologicznym za prawidłowe, nie stanowią one jednak ostatecznego potwierdzenia tych rezultatów. Pozostałe 8 przypadków porównano z materiałem histopatologicznym. Cztery oceniane wycinki pochodziły z trzustki. W trzech ocena preparatów histopatologicznych barwionych metodą H+E jednoznacznie pozwoliła potwierdzić wynik ICC. W jednym przypadku wynik histopatologiczny stwierdzał obecność komórek nowotworowych w badanym materiale. Przeprowadzona reakcja IHC w ogólnej masie guza dała wynik ujemny. W świetle tych rezultatów wynik otrzymany w preparacie cytologicznym należy uznać za fałszywie ujemny, ponieważ uzyskany w trakcie BAC materiał pochodził właśnie ze środkowej części zmiany (fot. 47, 48, 49, 50). Do porównania czterech pozostałych wyników dysponowano materiałem pobranym spoza trzustki. W dwóch przypadkach pobrane zostały do badań histopatologicznych węzły chłonne. Wyniki przeprowadzonej oceny mikroskopowej sporządzonych preparatów wykluczyły obecność komórek nowotworowych diagnozując zapalenie oraz stwierdzając obecność histiocytozy w węzłach chłonnych. Dodatkowo w jednym przypadku dysponowano zapisami z przebiegu operacji. Zaznaczono w nich, że w obrębie głowy trzustki widoczny był lity guz. W trzecim przypadku preparat histopatologiczny sporządzony był ze skrawków pęcherzyka żółciowego, w którym zdiagnozowano proces zapalny. Tu również notatki z zabiegu chirurgicznego wskazywały na występowanie w obszarze głowy trzustki guza o litej strukturze. Ostatni materiał porównawczy pochodził z żołądka oraz dwunastnicy. Stwierdzono w nim zmiany odpowiadające chorobie trzewnej. W dokumentach sporządzonych w trakcie operacji zanotowano widoczny odczyn zapalny. Wszystkie cztery materiały histopatologiczne użyte do potwierdzenia negatywnego wyniku oznaczenia w rozmazach cytologicznych antygeny CA 19-9 wykluczały proces nowotworowy. Nie były one jednak pobrane z trzustki lecz z innych narządów, dlatego ich wartość diagnostyczna ma ograniczone znaczenie.

Ostatnią, IV grupę, stanowiły 42 badania, których wynik badania cytologicznego był prawidłowy (schemat 4). Po przeprowadzeniu reakcji ICC w tym materiale

Schemat 4: Wyniki uzyskane w grupie IV.



otrzymano 35 wyników ujemnych, potwierdzających rezultat oceny cytologicznej (fot. 51, 52) oraz 6 wyników dodatnich. W jednym przypadku w trakcie prac laboratoryjnych materiał spłynął ze szkiełka mikroskopowego. Sześć preparatów z pozytywnym wynikiem immunocytochemicznym wymagało dalszego potwierdzenia. W dwóch z nich nie dysponowano żadnym materiałem porównawczym. W opisie zabiegu operacyjnego pierwszego pacjenta stwierdzono występowanie licznych naczyń na głowie trzustki oraz niewielką ilość bursztynowego płynu w jamie otrzewnowej. Wykonano zespolenie jelitowo trzustkowe. W przypadku drugiego pacjenta w trakcie operacji stwierdzono guz głowy trzustki znacznie naciekający dwunastnicę, wykonano zespolenia omijające, pacjent po kilku dniach zmarł (fot. 53, 54). W obydwu przypadkach opisy zabiegów mogą sugerować, iż dodatni wynik IHC był uzasadniony. W czterech pozostałych przypadkach dysponowano materiałem histopatologicznym. Pierwszy wycinek pochodził z trzustki. W preparacie histopatologicznym sporządzonym z jego skrawków zdiagnozowano nowotwór tego narządu, dodatkowo przeprowadzono w nim także reakcję IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9, której pozytywny rezultat ostatecznie potwierdził dodatni wynik oznaczenia antygenu CA 19-9 w materiale cytologicznym (fot. 55, 56, 57, 58). Kolejne dwa materiały stanowiły węzły chłonne. W wykonanych z nich preparatach H+E stwierdzono występowanie zmian reaktywnych. W celu dalszej diagnostyki wykonano w obydwu przypadkach reakcję IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. W pierwszym otrzymano pozytywny wynik potwierdzający rezultat reakcji ICC, w drugim wynik był negatywny. Otrzymany negatywny rezultat w materiale pochodzącym z węzła chłonnego wykluczał przerzut komórek nowotworowych, nie wykluczał natomiast procesu nowotworowego w trzustce. Dodatkowo w opisie operacji zanotowano widoczny guz głowy trzustki. Dane te mogą sugerować, iż pozytywny wynik reakcji ICC był prawidłowy, przypadek ten nie został jednak ostatecznie wyjaśniony (fot. 59, 60, 61, 62). W ostatnim, czwartym przypadku, w preparacie cytologicznym po przeprowadzeniu reakcji ICC i oznaczeniu antygenu CA 19-9 uzyskano jedną grupę komórek, której błona wybarwiła się na brązowo, wskazując miejsce wiązania antygenu z przeciwciałem (fot. 63, 64). Materiał histopatologiczny jaki posiadano od tego pacjenta pochodził z pęcherzyka żółciowego. Wynik przeprowadzonej analizy mikroskopowej

stwierdzał jego zapalenie oraz widoczny w nim rozrost brodawkowaty błony śluzowej. Materiał ten nie miał jednak wartości porównawczej. W opisie zabiegu operacyjnego stwierdzono, że cała trzustka jest nieco obrzęknięta. Dane te nie pozwalają na ostateczne potwierdzenie uzyskanego wyniku, są jednak wyraźnym wskazaniem do obserwacji pacjenta.

5. Podsumowanie wyników.

W wyniku przeprowadzonej reakcji immunocytochemicznej w 156 preparatach w materiale pobranym w trakcie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej z trzustki otrzymano 114 rezultatów, które potwierdziły wynik analizy cytologicznej. W kolejnych 28 preparatach pochodzących od pacjentów z grupy III, w której postawienie ostatecznego rozpoznania było niemożliwe, uzyskano wyniki dodatnie oraz ujemne. W dalszym postępowaniu diagnostycznym 22 spośród nich zostały potwierdzone, w tym 15 na podstawie materiału histopatologicznego oraz 7 w porównaniu z zapisami sporządzonymi w trakcie trwania zabiegów operacyjnych. Pięć wyników pozostało niewyjaśnionych, a w jednym uzyskano wynik fałszywie ujemny. W grupach I, II oraz IV w 10 przypadkach otrzymane wyniki reakcji antygen – przeciwciała były niezgodne z rozpoznaniem postawionym po analizie preparatów barwionych metodą H+E i także wymagały dalszej diagnostyki. W dziewięciu potwierdzono wynik reakcji ICC, w tym 5 przypadków porównano z materiałem histopatologicznym a 4 skonfrontowano z opisami zabiegów operacyjnych. Jeden przypadek został uznany za ostatecznie niewyjaśniony. W trakcie prowadzenia badań z 3 preparatów spłynął materiał, natomiast w jednym przypadku po przeprowadzeniu reakcji ICC i przeanalizowaniu preparatu uznano, że ilość materiału jest zbyt skąpa i preparat jest niediagnostyczny. Wyniki uzyskane po przeprowadzeniu reakcji ICC w czterech badanych grupach przedstawia tabela 2. Po przeanalizowaniu całości materiału, zarówno cytologicznego jak i histopatologicznego oraz wykonanych na tych materiałach reakcji immunocytochemicznych oraz immunohistochemicznych i uzupełnieniu tych danych o informacje zawarte w opisach przeprowadzonych zabiegów dokonano porównania otrzymanych wyników. Zestawienie to prezentowane jest w tabeli nr 3. Wynika z niego jednoznacznie, iż dzięki zastosowaniu metody ICC pozwalającej na oznaczenie w badanym materiale antygenu CA 19-9 wyeliminowano wyniki, w których postawienie ostatecznej diagnozy było niemożliwe. Rezultaty otrzymane po przeprowadzeniu reakcji antygen – przeciwciała są znacznie zbliżone do rezultatów otrzymanych po przeanalizowaniu dostępnego materiału porównawczego oraz opisów zabiegów operacyjnych.

Tabela 2: Wyniki uzyskane po oznaczeniu markera nowotworowego CA 19-9 metodą immunocytochemiczną na materiale pobranym z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej.

Numer grupy	Wynik reakcji ICC pozytywny	Wynik reakcji ICC negatywny	Brak materiału po wykonaniu reakcji ICC lub materiał niediagnostyczny
Grupa I	53	1	1
Grupa II	3	26	1
Grupa III	17	11	1
Grupa IV	6	35	1

Tabela 3: Porównanie wyników otrzymanych w preparatach sporządzonych z materiału pobranego w trakcie BAC, wybarwionych hematoksyliną i eozyną z wynikami otrzymanymi w preparatach cytologicznych z BAC, w których oznaczono antygen CA 19-9 za pomocą reakcji ICC oraz ostatecznymi ustaleniami opartymi na wynikach cytologicznych, immunocytochemicznych, histopatologicznych, immunohistopatologicznych oraz opisach zabiegów operacyjnych.

Wynik analizy mikroskopowej	Wynik BAC (H+E)	Wynik ICC (preparaty cytologiczne)	Ostateczne rozpoznanie ustalone na podstawie wyników cytologicznych, ICC, histopatologicznych, IHC oraz opisów zabiegów operacyjnych
Komórki nowotworowe	55	79	78
Komórki prawidłowe oraz widoczny proces zapalny	72	73	67
Przypadki wątpliwe	29	-	6
Wynik fałszywie ujemny	-	-	1
Preparaty niediagnostyczne	-	4	4

6. DYSKUSJA

Występowanie raka trzustki wśród mieszkańców Stanów Zjednoczonych pozostaje niezmiennie od pół wieku. W tym okresie dokonano ogromnego postępu w dziedzinie diagnostyki oraz leczenia nowotworów. Mimo to w państwach zachodnich *adenocarcinoma pancreatis* w dalszym ciągu pozostaje jedną z głównych przyczyn zgonów wywołanych przez raki (80). W szerokim panelu markerów nowotworowych nie istnieje bowiem taki, który byłby specyficzny tylko dla tej jednostki chorobowej. W artykule opublikowanym przez Deckera, Batheja, Collinsa i wsp. autorzy przedstawiają szereg możliwości jakimi dysponuje obecnie lekarz prowadzący diagnostykę zmian patologicznych trzustki. Przykłady te opisują zarówno oznaczania markerów nowotworowych występujących w surowicy krwi jak i dostępną technologię obrazowania. Podkreślają oni jednak, iż na chwilę obecną lekarze nie dysponują żadnym programem ani schematem mówiącym o skreeningu u osób, u których stwierdzono wysokie prawdopodobieństwo zachorowania na raka trzustki (5, 18). Celem współczesnych naukowców jest odnalezienie związku chemicznego, którego występowanie w organizmie związane będzie jedynie z rozwijającymi się komórkami nowotworowymi trzustki. Poszukiwana jest także metoda, która umożliwi jego oznaczenie w pierwszym stadium choroby, umożliwiając tym samym wczesną diagnostykę oraz całkowite wyleczenie pacjenta, poprzez usunięcie zmiany. Gdy w 1979 roku Koprowski i wsp. dokonali odkrycia antygenu CA 19-9 został on szybko uznany za złoty standard w diagnostyce raka trzustki. Dalsze badania wykazały jednak, iż antygen ten nie jest specyficzny i towarzyszy nowotworom przewodu pokarmowego (4, 6), a jego obecność w surowicy związana jest dopiero z zaawansowanym stadium raka trzustki (72, 82). W dostępnym piśmiennictwie czytamy, iż w roku 2006 ASCO wydało opinię, że antygen CA 19-9 oznaczany w surowicy krwi nie jest rekomendowany jako samodzielny czynnik rokowniczy raka trzustki (18, 71). Stanowisko to zostało poparte w roku 2010 przez EGTM (6, 20). Liczne doświadczenia prowadzone z użyciem antygenu CA 19-9 dowiodły, iż jego poziom w surowicy krwi u chorych, u których zdiagnozowano raka trzustki może być stosowany jako czynnik przepowiadający możliwość wystąpienia przerzutów (45). Ma on również znaczną wartość przy przedoperacyjnej ocenie

resekcyjności (45, 106). Jego oznaczenie wykonywane po przeprowadzeniu zabiegu znalazło także zastosowanie jako czynnik determinujący przeżycie (22, 31, 33, 49, 52, 58, 60, 70, 74) oraz monitorujący skuteczność zastosowanego leczenia (37, 46, 50, 92, 97). W roku 2010 Fritz, Hackert, Hinz i wsp. opublikowali pracę, w której donoszą, iż oznaczanie w surowicy krwi poziomu antygenu CA 19-9 u pacjentów ze zdiagnozowanym wewnątrzprzewodowym brodawkowatym nowotworem śluzowym stanowi czynnik różnicujący zmiany łagodne od złośliwych (24). Ze względu na niekorzystne rekomendacje oraz niską specyficzność antygenu CA 19-9 zaczęto poszukiwać innych związków, które w połączeniu z CA 19-9 dałyby pożądany efekt w postaci gotowego panelu biomarkerów diagnozujących wczesne stadium raka trzustki. W publikacjach z ostatnich lat czytamy o możliwościach zastosowania CA 19-9 w kombinacji między innymi z PAM4 lub CEA i MCSF (10, 14, 68, 76). Mimo, iż propozycje przedstawiane przez autorów osiągnęły wysoki poziom skuteczności nie znalazły dotychczas szerszego zastosowania. Najnowsze badania donoszą także o zastosowaniu nośników białkowych w celu oznaczenia we krwi pacjentów antygenu CA 19-9 (102, 103). Mimo, iż marker nowotworowy CA 19-9 uważany jest za najlepiej zwalidowany i najszerzej stosowany w diagnostyce raka trzustki (20), jego niska czułość i specyficzność przyczynia się do poszukiwania innych możliwości, dających szansę na wczesną diagnostykę i pełne wyleczenie pacjenta. Według niektórych naukowców metoda wykorzystująca CA 19-9 zostanie wkrótce wyparta przez oznaczenia mutacji genowych, licznie występujących w tej zmianie patologicznej (96).

Wśród tak licznych doniesień charakteryzujących antygen CA 19-9 oraz jego zastosowanie, nie widnieje żadna pozycja mówiąca o oznaczaniu tego markera metodami immunocytochemicznymi w materiale cytologicznym trzustki. W dostępnych źródłach czytamy jedynie, iż właściwą metodą pobrania materiału przeznaczonego do diagnostyki cytologicznej raka trzustki jest użycie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (3, 5). Metoda punkcji zmiany za pomocą igły została opisana po raz pierwszy przez Abu al- Qasima około roku 1000, kolejne doniesienia na temat biopsji aspiracyjnej pojawiły się w pierwszej połowie XIX wieku. Od tamtego czasu technika ta znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce różnych schorzeń (19). BAC opisywana jest jako metoda minimalnie inwazyjna, bezpieczna, efektywna i szybka (77). Mimo to na temat

przydatności jej stosowania toczone są często interdyscyplinarne dyskusje (53). William Brugge w swoim artykule: „Pancreatic Fine Needle Aspiration: To Do or not To Do?” (13) rozważa, czy zastosowanie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej w diagnostyce raków trzustki jest postępowaniem słusznym i koniecznym. We wnioskach wysuniętych przez tego autora czytamy, że istnieją dwa główne wskazania do wykonania BAC tego narządu. Pierwszym jest konieczność potwierdzenia obecności zmiany złośliwej przed wprowadzeniem chemioterapii, drugim - BAC jest metodą niezbędną w ocenie atypowych zmian litych trzustki. W kolejnym artykule odnajdujemy informacje na temat zastosowania technik immunocytochemicznych na aspiratach z trzustki. Czytamy w nim, iż z powodzeniem przeprowadzono reakcje antygen – przeciwciało w materiale pobranym z guzów endokrynych tego narządu metodą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. W tak pozyskanym materiale diagnostycznym oznaczone zostały następujące markery: chromogranina, synaptofizyna, NSE, CD 56, PGP 9.5 oraz p53 (16). Dostępne publikacje opisują także wykorzystanie materiału cytologicznego pobranego za pomocą BAC w technice PCR (9, 63, 93). Istotnym czynnikiem wpływającym na właściwe pobranie materiału techniką biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej jest technologia obrazowania zmiany chorobowej. Brugge uważa, że pobierając materiał za pomocą BAC ze zmian dużych, nieoperacyjnych należy wykorzystać tomografię komputerową lub USG. Aspiracja ze zmian małych powinna natomiast odbywać się metodą EUS/FNAB (13). Badania przeprowadzone przez Deckera, Mashaja, Batheja i wsp. udowodniły, iż wśród licznych dostępnych urządzeń ultrasonografia endoskopowa (EUS) jest metodą najbardziej czułą (18). Tematem tym zajmowali się także Lewitowicz, Matykiewicz, Heciak i wsp. (54). Udowodnili oni, iż z równie dużą skutecznością można stosować przezskórną biopsję aspiracyjną cienkoigłową kontrolowaną przy pomocy USG. Również Zamboni, D’Onofrio oraz Indili w swoim artykule donoszą, że metoda ta jest dokładna i bezpieczna (105). Mimo, iż technika ta jest mniej inwazyjna, nie wyparła ona EUS/FNAB. Dalsze badania z jej wykorzystaniem wskazały, że jest ona najefektywniejsza w diagnostyce guzów trzustki (16, 17). Udowodniono, iż EUS/FNAB jest metodą najbardziej bezpieczną dla pacjenta, charakteryzującą się wysoką dokładnością oraz pozytywną wartością rokowniczą w przedoperacyjnym postępowaniu z resekcyjnym rakiem trzustki (2, 27, 41).

Również dystans jaki ma do pokonania igła w metodzie EUS/FNAB jest mniejszy niż przy innych metodach pobierania materiału za pomocą biopsji, co minimalizuje szerzenie się choroby, Dotyczy to zwłaszcza przypadków, w których zmiana o charakterze guzowatym zlokalizowana jest w głowie trzustki (27). Donoszono także, że rozmiar igły użytej w trakcie pobierania materiału wpływa na wynik badania. Większa średnica igły zapewnia większą czułość stosowanej metody (104). Stwierdzenie to stało się podstawą do badań przeprowadzonych przez Yanga i wsp.. Badacze porównali metodę przezskórnej biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej oraz gruboigłowej (skrawkowej) wykonywanej pod kontrolą USG. Przeprowadzona analiza wykazała podobną efektywność obydwu metod. Również czułość i specyficzność użytych technik okazała się bez znaczącej różnicy (101). Amin, Theis, Russell i wsp. w swoim artykule opisali metodę przezskórnej biopsji aspiracyjnej gruboigłowej. Sugerowali oni, że metoda ta w połączeniu z tomografią komputerową jest właściwą techniką pobierania materiału z trzustki. We wnioskach zastrzegli jednak, że metoda ta jest bardziej odpowiednia dla pacjentów młodszych, jak również tych o mniejszej masie. W przypadku osób starszych autorzy sugerują, że biopsję gruboigłową należy wykonywać tylko w przypadkach, w których tomografia komputerowa wykaże zmiany atypowe. Głównym powodem tych wniosków są powikłania, które mogą wystąpić u pacjenta po pobraniu materiału (1). Na komplikacje pojawiające się po aspiracji metodą skrawkową zwrócili także uwagę w swojej pracy Gwoździewicz, Pieńskowska, Szlęzak i wsp. (29). Wykazali oni, że przezskórna biopsja gruboigłowa może doprowadzić do licznych niepożądanych następstw. Wśród mniej szkodliwych dla pacjenta wymienić należy ból w obrębie miejsca nakłucia oraz nudności. Zaobserwowano także przedłużone krwawienie z miejsca pobrania materiału, przetoki trzustkowo-otrzewnowe, krwiaki, wycieki żółci lub soku trzustkowego, ostre zapalenie trzustki (OZT) oraz rozwinięcie niewydolności wielonarządowej, której efektem może być zgon (29). Liczni autorzy zwrócili natomiast uwagę, że w przypadku biopsji cienkoigłowych powikłania występowały bardzo rzadko (1 - 2% przypadków) i były niegroźne dla pacjenta. Wymieniają tu przede wszystkim krwawienie z miejsca pobrania ustępujące samoczynnie oraz zapalenie trzustki w nieznacznym nasileniu (13, 48, 100). W toku badań przeprowadzonych przez Changa, Nguyena, Ericksona i wsp. tylko u jednego pacjenta odnotowano

gorączkę (17), natomiast Yusuf, Ho, Pavey i wsp. (104) nie zanotowali żadnych komplikacji. W świetle tych doniesień zasadnym staje się stosowanie techniki aspiracji materiału do badań cytologicznych za pomocą biopsji cienkoigłowej.

Współczesna diagnostyka napotyka na wiele problemów. Zespół naukowców kierowany przez profesor Jadwigę Snarską opisał przypadki współistnienia OZT i raka trzustki oraz problemy związane z postawieniem ostatecznego wyniku u tych pacjentów (83). W 2012 roku Brauner, Lachter, Ben-Ishay i wsp. opisali przypadek zapalenia trzustki, błędnie zdiagnozowany jako rak tego narządu (11). W dostępnym piśmiennictwie czytamy także, iż ocena cytologiczna materiału pobranego przy pomocy EUS/FNAB wiąże się z możliwością wystąpienia wyników fałszywie dodatnich (38, 79). Przeszkody te mogą zostać rozwiązane dzięki schematowi postępowania, który przedstawili Zubarik, Gordon, Lidofsky i wsp. (108). Opiera się on na oznaczeniu antygenu CA 19-9 w surowicy krwi pacjenta, wykonaniu badania przy pomocy EUS oraz, w przypadku stwierdzenia widocznej zmiany, pobrania materiału za pomocą FNAB. Jak twierdzą autorzy protokół ten daje znacznie większą szansę zdiagnozowania raka trzustki w pierwszym stadium niż inne powszechnie stosowane schematy diagnostyczne (108).

W świetle tak licznych doniesień na temat zastosowania antygenu CA 19-9 oraz techniki EUS/FNAB do pobierania materiału ze zmian guzowatych trzustki nie znaleziono żadnego artykułu traktującego o zastosowaniu CA 19-9 w materiale pobranym za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej z wykorzystaniem metod immunocytochemicznych. Analiza przeprowadzonych badań będących przedmiotem tej rozprawy udowodniła, że oznaczanie antygenu CA 19-9 w materiale cytologicznym pobranym z trzustki za pomocą BAC przynosi pożądaną efekt w postaci jednoznacznego wyniku stwierdzającego lub wykluczającego proces nowotworowy. Technika ta wyeliminowała w badanym materiale przypadki wątpliwe, jak również ostatecznie pozwoliła na różnicowanie zmian zapalnych od nowotworowych, co w obecnych czasach stanowi powszechnie występujący problem kliniczny (83). Otrzymane rezultaty mogą sugerować, że wprowadzenie tego oznaczenia do rutynowej diagnostyki a zwłaszcza do schematu postępowania zaproponowanego przez Zubarika, Gordona, Lidofsky'ego i wsp. może przyczynić się do powstania skutecznej metody wczesnego diagnozowania raków trzustki (108). Fakt, iż zastosowanie

techniki EUS/FNAB wzrasta i staje się rutyną w diagnostyce raka trzustki (100) jak również pozytywne rezultaty otrzymane w przeprowadzonych badaniach będących tematem tej pracy pozwalają optymistycznie wnioskować, że sugerowany powyżej algorytm postępowania może odnieść sukces we wczesnej diagnostyce raka gruczołowego trzustki.

7. WNIOSKI

1. W przeprowadzonej pracy badawczej wykazano, że oznaczanie markera nowotworowego CA 19-9 w materiale pochodzącym z BAC trzustki za pomocą metod immunocytochemicznych ma znaczącą wartość w diagnostyce raka tego narządu. Technika ta okazała się także przydatna w różnicowaniu stanu zapalnego od procesu nowotworowego trzustki.
2. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników odwołano się do rezultatów oceny cytologicznej. Wyniki niejednoznaczne wyjaśniono odnosząc się do dostępnych wyników histopatologicznych, w uzasadnionych przypadkach na materiale tym wykonano także reakcję IHC z oznaczeniem CA 19-9. W nielicznych przypadkach powołano się na treść zapisów dotyczących przebiegu operacji danego pacjenta. Czynności te pozwoliły na postawienie ostatecznego rozpoznania w 149 przypadkach ze 152 badanych. Cztery badania ze względu na brak materiału lub niediagnostyczny preparat nie były poddane analizie.
3. Brak dostępnego piśmiennictwa dotyczącego oznaczania antygenu CA 19-9 w materiale pozyskanym z trzustki przy użyciu techniki BAC uniemożliwił porównanie otrzymanych wyników z innymi źródłami. Autor po przeanalizowaniu uzyskanych rezultatów uważa, że wprowadzenie metody ICC oznaczającej marker nowotworowy GICA w aspiratach z trzustki do rutynowej diagnostyki może przyczynić się do wykrywania gruczolaka tego narządu we wczesnym stadium, umożliwiając jednocześnie pełne wyleczenie pacjenta.

8. PIŚMIENICTWO

1. Amin Z., Theis B., Russell R.C.G. et al.: *“Diagnosing pancreatic cancer: the role of percutaneous biopsy and CT”*. Clinical Radiology 2006, 61:996-1002.
2. Ardengh J.C., Malheiros C.A., Pereira V., Coelho D.E., Coelho J.F., Rahal F.: *“Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using helical computerized tomography for TN staging and vascular injury in operable pancreatic carcinoma”*. JOP. 2009, 10(3):310-317.
3. Arnold F., Tietze V., Penzlin G., Urban H., Schramm H.: *“Intrasurgical diagnostics in the case of suspected pancreatic cancer—the cytology”*. Zentralbl. Chir. 2003, 128(5):379-382.
4. Ballehaninna U.K., Chamberlain R.S.: *“Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review”*. Indian J. Surg. Oncol. 2011, 2(2): 88–100.
5. Bellizzi A.M., Stelow E.B.: *“Pancreatic cytopathology: a practical approach and review”*. Arch. Pathol. Lab. Med. 2009, 133(3):388-404.
6. Bhat K., Wang F., Ma Q., Li Q., Mallik S., Hsieh T.C., Wu E.: *“Advances in biomarker research for pancreatic cancer”*. Curr. Pharm. Des. 2012, 18(17):2439-2451.
7. Blackford A., Parmigiani G., Kensler T.W., Wolfgang C., Jones S., Zhang X., Parsons D.W., Cheng-Ho Lin J., Leary R.J., Eshleman J.R., Goggins M., Jaffee E.M., Iacobuzio-Donahue C.A., Maitra A., Klein A., Cameron J.L., Olin K., Schulick R., Winter J., Vogelstein B., Velculescu V.E., Kinzler K.W., Hruban R.H.: *“Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer”*. Cancer Res. 2009, 69(8): 3681–3688.
8. Boenisch T., Taylor C.R., Farmilo A.J., Stead R.H., Happel J.F., Rashmil S., Badve S., Key M., Robinson J.P., Sturgis J., Winther L., Osborn D., Zucker R.W., Bisgaard K., Kumar G.L., Pace G.E., Schmid J., Verardo M., Spaulding D.C., Atwood K.N., Rudbeck L., Winther H., Jensen S.S., Müller S., Matthiesen S.H., Nielsen K.V., Henriksen U., Schönau A., Christensen N.K., Wendelboe H.G., Rasmussen O.F.:

Immunohistochemistry staining methods; *“Education Guide: Immunohistochemical staining methods. Fifth edition”*. Red. Kumar G.L., Rudbeck L., DAKO North America, Carpinteria 2009, 57-60.

9. Bournet B., Souque A., Senesse P., Assenat E., Barhet M., Lesavre N., Aubert A., O’Toole D., Hammel P., Levy P., Ruszniewski P., Bouisson M., Escourrou J., Cordelier P., Buscail L.: *“Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis.”* Endoscopy. 2009, 41(6):552-557.
10. Brand R.E., Nolen B.M., Zeh H.J., Allen P.J., Eloubeidi M.A., Goldberg M., Elton E., Arnoletti J.P., Christein J.D., Vickers S.M., Langmead C.J., Landsittel D.P., Whitcomb D.C., Grizzle W.E., Lokshin A.E.: *“Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer”*. Clin. Cancer Res. 2011, 17(4):805-816.
11. Brauner E., Lachter J., Ben-Ishay O., Vlodaysky E., Kluger Y.: *“Autoimmune pancreatitis misdiagnosed as a tumor of the head of the pancreas”*. World J. Gastrointest. Surg. 2012, 4(7):185-189.
12. Brelińska R., Drąg-Zalesińska M., Dworacki G., Jaroszewski J., Jeleń M., Kasprzak A., Kawiak J., Krop-Wątopek A., Litwin J., Maryniak R., Podhorska-Okolów M., Rzeszutko M., Szymaś J., Ugorski M., Warchoń J., Zabel M., Żeromski J.: *„Immunocytochemia”*. Wydawnictwo Naukowe PWN, W-wa, 1999, 13-82, 285-291.
13. Brugge WR: Pancreatic Fine Needle Aspiration: *“To Do or not To Do?”*. JOP. J Pancreas (Online) 2004, 5(4): 282-288.
14. Bünger S., Laubert T., Roblick U.J., Habermann J.K.: *“Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer: a current overview.”* J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2011, 137(3):375-389.
15. Chakraborty S., Baine M.J., Sasson A.R., Batra S.K.: *“Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer”*. Biochim. Biophys. Acta. 2011, 1815(1):44-64.
16. Chang F., Chandra A., Culora G., Mahadeva U., Meenan J, Herbert A.: *“Cytologic diagnosis of pancreatic endocrine tumors by endoscopic*

- ultrasound-guided fine-needle aspiration: a review*". *Diagn. Cytopathol.* 2006, 34:9 649–658.
- 17.Chang K.J., Nguyen P., Erickson R.A., Durbin T.E., Katz K.D.: *"The clinical utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of pancreatic carcinoma"*. *Gastrointest. Endosc.* 1997, 45:5 387-393.
 - 18.Decker G.A., Batheja M.J., Collins J.M., Silva A.C., Mekeel K.L., Moss A.A., Nguyen C.C., Lake D.F., Miller L.J.: *"Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening"*. *Gastroenterol. Hepatol. (NY)*. 2010, 6(4):246-254.
 - 19.Diamantis A., Magiorkinis E., Koutselini H.: *"Fine-needle aspiration (FNA) biopsy: historical aspects"*. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009, 47, 2:191-197.
 - 20.Duffy M.J., Sturgeon C., Lamerz R., Haglund C., Holubec V.L., Klapdor R., Nicolini A., Topolcan O., Heinemann V.: *"Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) statut report"*. *Ann. Oncol.* 2010, 21(3):441-447.
 - 21.Eskelinen M.J., Haglund U.H.: *"Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods"*. *Eur. J. Surg.* 1999, 165:4 292-306.
 - 22.Ferrone C.R., Finkelstein D.M., Thayer S.P., Muzikansky A., Fernandez-delCastillo C., Warshaw A.L.: *"Perioperative CA 19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma"*. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24(18):2897-2902.
 - 23.Franzen S., Giertz G., Zajicek J.: *"Cytological diagnosis of prostatic tumours by transrectal aspiration biosy. A preliminary report"*. *Brit. J. Urol.* 1960, 32:193-196.
 - 24.Fritz S., Hackert T., Hinz U., Hartwig W., Büchler M.W., Werner J.: *"Role of serum carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen in distinguishing between benign and invasive intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas"*. *Br J Surg.* 2011, 98: 104-110.

25. Gallus S., Turati F., Tavani A., Polesel J., Talamini R., Franceschi S., La Vecchia C.: *“Soft drinks, sweetened beverages and risk of pancreatic cancer”*. *Cancer Causes Control*. 2011, 22(1):33-39.
26. Goggins M.: *“Markers of pancreatic cancer: working toward early detection”*. *Clin. Cancer. Res.* 2011, 17(4):635-637.
27. Goldin SB., Bradner MW., Zervos EE., Rosemurgy AS. 2nd: *“Assessment of Pancreatic Neoplasms: Review of Biopsy Techniques”*. *J Gastrointest Surg* 2007, 11(6): 783-790.
28. Greig E.D., Gray A.C.: *“Note of the Lymphatic Gland In Sleeping Sickness”*. *Br. Med. J.* 1904, 1(2265):1252.
29. Gwoździwicz K. Pieńskowska J., Szlęzak P., Czarnowska-Cubała M., Markiet K., Gorycki T., Studniarek M.: *„Ocena przydatności i ograniczeń przez skórnej biopsji skrawkowej w diagnostyce guzów trzustki – analiza retrospektywna”*. *Postępy Nauk Medycznych* 2015, XXVIII, nr 5: 312-316.
30. Haas M., Heinemann V., Kullmann F., Laubender R.P., Klose C., Bruns C.J., Holdenrieder S., Modest D.P., Schulz C., Boeck S.: *“Prognostic value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and bilirubin levels in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results from a multicenter, pooled analysis of patients receiving palliative chemotherapy”*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013, 139(4):681-689
31. Hammad N., Heilbrun L.K., Philip P.A., Shields A.F., Zalupski M.M., Venkatramanamoorthy R., El-Rayes B.: *“CA 19-9 as a predictor of tumor response and survival in patients with advanced pancreatic cancer treated with gemcitabine based chemotherapy”*. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 2010, 6(2):98-105.
32. Hassan M.M., Bondy M.L., Wolff R.A., Abbruzzese J.L., Vauthey J.N., Pisters P.W., Evans D.B., Khan R., Ta-Hsu Chou, Lenzi R., Jiao L., Li D.: *“Risk factors for pancreatic cancer: case-control study”*. *Am. J. Gastroenterol.* 2007, 102(12): 2696–2707.
33. Hernandez J.M., Cowgill S.M., Al-Saadi S., Collins A., Ross S.B., Cooper J., Villadolid D., Zervos E., Rosemurgy A.: *“CA 19-9 velocity predicts*

- disease-free survival and overall survival after pancreatectomy of curative intent*". J. Gastrointest. Surg. 2009, 13:2 349-353.
- 34.Hidalgo M.: "*Pancreatic cancer*". N. Eng. J. Med. 2010, 29;362(17):1605-1617.
- 35.Hong S.M., Park J.Y., Hruban R.H., Goggins M.: "*Molecular signatures of pancreatic cancer*". Arch. Pathol. Lab. Med. 2011, 135(6):716-727.
- 36.House A.J., Thomson K.R.: "*Evaluation of a new transthoracic needle for biopsy of benign and malignant lung lesions*". AJR Am. J. Roentgenol. 1977, 129(2):215–220.
- 37.Humphris J.L., Chang D.K., Johns A.L., Scarlett C.J., Pajic M., Jones M.D., Colvin E.K, Nagrial A., Chin V.T., Chantrill L.A., Samra J.S., Gill A.J., Kench J.G., Merrett N.D., Das A., Musgrove E.A., Sutherland R.L., Biankin A.V.: "*The prognostic and predictive value of serum CA 19.9 in pancreatic cancer*". Ann. Oncol. 2012, 23(7):1713-1722.
- 38.Jarboe E.A., Layfield L.J.: "*Cytologic features of pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatitis: potential pitfalls in the diagnosis of pancreatic ductal carcinoma*". Diagn. Cytopathol. 2011, 39(8):575-581.
- 39.Jiao L., Silverman D.T., Schairer C., Thiébaud A.C.M., Hollenbeck A.R., Leitzmann M.F., Schatzkin A., Stolzenberg-Solomon R.Z.: "*Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study*". Am. J. Epidemiol. 2009, 169(9): 1043–1051.
- 40.Jonckheere N., Skrypek N., Merlin J., Dessein A.F., Dumont P., Leteurtre E., Harris A., Desseyn J.L., Susini C., Frénois F., Van Seuningen I.: "*The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways*". PLoS One. 2012, 7(2):e32232.
- 41.Karoumpalis I., Sigalas P., Salla C., Diakatou E., Balatsos V., Zografos G., Delis V.: "*Endoscopic ultrasound staging and guided fine needle aspiration biopsy in patients with resectable pancreatic malignancies: a single-center prospective experience.*" Onkologie. 2011, 34(10):533-537.

- 42.Kaur S., Baine M.J., Jain M., Sasson A.R., Batra S.K.: *“Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new Development”*. *Biomark Med.* 2012, 6(5): 597–612.
- 43.Kawiak J., Osuchowska Z., Jakóbiński M.: *Antygeny związane z nowotworami na przykładzie nowotworów przewodu pokarmowego. „Ultrastruktura i funkcja komórki”*. PWN, 1991 W-wa; 17-23.
- 44.Kelber J.A., Reno T., Kaushal S., Metildi C., Wright T., Stoletov K., Weems J.M., Park F.D., Mose E., Wang Y., Hoffman R.M., Lowy A.M., Bouvet M., Klemke R.L.: *“KRas induces a Src/PEAK1/ErbB2 kinase amplification loop that drives metastatic growth and therapy resistance in pancreatic cancer”*. *Cancer Res.* 2012, 72(10):2554-2564.
- 45.Kim T.H., Han S.S., Park S.J., Lee W.J., Woo S.M., Yoo T., Moon S.H., Kim S.H., Hong E.K., Kim D.Y., Park J.W.: *“CA 19-9 level as indicator of early distant metastasis and therapeutic selection in resected pancreatic cancer”*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011, 81(5):743-748.
- 46.Klapdor R., Bahlo M., Babinski A., Klapdor S.: *“CA 19-9 serum concentration – analysis of the serum kinetics during first line therapy of pancreatic cancer in relation to overall survival.”* *Anticancer Res.* 2010, 30(5):1869-1874.
- 47.Klein AP.: *“Genetic susceptibility to pancreatic cancer”*. *Mol. Carcinog.* 2012, 51(1): 14–24.
- 48.Kocjan G.: *“Fine needle aspiration cytology of the pancreas: a guide to the diagnostic approach”*. *Coll. Antropol.* 2010, 34(2):749-756.
- 49.Kondo N., Murakami Y., Uemura K., Hayashidani Y., Sudo T., Hashimoto Y., Nakashima A., Sakabe R., Shigemoto N., Kato Y., Ohge H., Sueda T.: *“Prognostic impact of perioperative serum CA 19-9 levels in Patients with resectable pancreatic cancer”*. *Ann. Surg. Oncol.* 2010, 17(9):2321-2329.
- 50.Korkmaz M., Ünal H., Selcuk H., Yilmaz U.: *“Extraordinarily elevated serum levels of CA 19-9 and rapid decrease after successful therapy: A case report and review of literature”*. *Turk. J. Gastroenterol.* 2010, 21(4): 461-463.

- 51.Kumar V., Cortan R.S., Robbins S.L.: *Trzustka. "Robbins Patologia"*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2005, 731-754.
- 52.Lee K.J., Yi S.W., Chung M.J., Park S.W., Song S.Y., Chung J.B., Park J.Y.: "*Serum CA 19-9 and CEA levels as a prognostic factor in pancreatic adenocarcinoma*". *Yonsei Med. J.* 2013, 54(3): 643–649.
- 53.Lachter J., Rosenthal Y., Kluger Y.: "*A multidisciplinary survey on controversies in the use of EUS-guided FNA: assessing perspectives of surgeons, oncologists and gastroenterologists*". *BMC Gastroenterol.* 2011, 11:117.
- 54.Lewitowicz P., Matykiewicz J., Heciak J., Koziel D., Gluszek S.: "*Percutaneous fine needle biopsy in pancreatic tumors: a study of 42 cases*". *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012, 2012: 908963.
- 55.Lucenteforte E., La Vecchia C., Silverman D., Petersen G.M., Bracci P.M., Ji B.T., Bosetti C., Li D., Gallinger S., Miller A.B., Bueno-de-Mesquita H.B., Talamini R., Polesel J., Ghadrian P., Baghurst P.A., Zatonski W., Fontham E., Bamlet W.R., Holly E.A., Gao Y.T., Negri E., Hassan M., Cotterchio M., Su J., Maisonneuve P., Boffetta P., Duell E.J.: "*Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4)*". *Ann. Oncol.* 2012, 23(2):374-382.
- 56.Lundin J., Roberts P.J., Kuusela P., Haglund C.: "*The prognostic value of preoperative serum levels of CA 19-9 and CEA in patients with pancreatic cancer*". *Br. J. Cancer.* 1994, 69(3):515-519.
- 57.MacGregordas A.M., Iacobuzio-Donahue C.A.: "*Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis*". *J. Surg. Oncol.* 2013, 107(1): 8-14.
- 58.Maisey N.R., Norman A.R., Hill A., Massey A., Oates J., Cunningham D.: "*CA 19-9 as a prognostic factor in inoperable pancreatic cancer: the implication for clinical trials*". *Br. J. Cancer.* 2005, 93(7):740-743.
- 59.Martin H.E., Ellis E.B.: "*Biopsy by Needle Puncture and Aspiration*". *Ann. Surg.* 1930, 92, 2, 169-181.
- 60.Mehta J., Prabhu R., Eshpuniyani P., Kantharia C., Supe A.: "*Evaluating the efficacy of tumor markers CA 19-9 and CEA to predict operability and*

survival in pancreatic malignancies". Trop. Gastroenterol. 2010, 31(3):190-194.

61. Michaud D.S., Vrieling A., Jiao L., Mendelsohn J.B., Steplowski E., Lynch S.M., Wactwaski-Wende J., Arslan A.A., Bas Bueno-de-Mesquita H., Fuchs C.S., Gross M., Helzlsouer K., Jacobs E.J., Lacroix A., Petersen G., Zheng W., Allen N., Ammundadottir L., Bergmann M.M., Boffetta P., Buring J.E., Canzian F., Chanock S.J., Clavel-Chapelon F., Clipp S., Freiberg M.S., Michael Gaziano J., Giovannucci E.L., Hankinson S., Hartge P., Hoover R.N., Allan Hubbell F., Hunter D.J., Hutchinson A., Jacobs K., Kooperberg C., Kraft P., Manjer J., Navarro C., Peeters P.H., Shu X.O., Stevens V., Thomas G., Tjønneland A., Tobias G.S., Trichopoulos D., Tumino R., Vineis P., Virtamo J., Wallace R., Wolpin B.M., Yu K., Zeleniuch-Jacquotte A., Stolzenberg-Solomon R.Z.: "*Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan)*". Cancer Causes Control. 2010, 21(8):1213-1225.
62. Moller J.T.: "*Transrectal cytological aspiration biopsy in prostatic disease*." Int. Urol. Nephrol. 1977, 9(3):235-240.
63. Mora J., Puig P., Boadas J., Urgell E., Montserrat E., Lerma E., González-Sastre F., Lluís F., Farré A., Capellá G.: "*K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits*". Clin. Chem. 1998, 44(11):2243-2248.
64. Mueller N.T., Odegaard A., Anderson K., Yuan J.M., Gross M., Koh W.P., Pereira M.A.: "*Soft drink and juice consumption and risk of pancreatic cancer: the Singapore Chinese Health Study*". Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010, 19(2):447-455.
65. Nitsche C., Simon P., Ulrich Weiss F.: "*Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer*". Dig. Dis. 2011, 29: nr 2 235-242.
66. Orłowski K.: "*Histologia*". PZWL, W-wa 1988, 15:521-526.

67. Ottenhof N.A., de Wilde R.F., Maitra A., Hruban R.H., Offerhaus G.J.A.:
“*Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma*”.
Patholog. Res. Int. 2011, 2011: 620601.
68. Park H.D., Kang E.S., Kim J.W., Lee K.T., Lee K.H., Park Y.S., Park J.O.,
Lee J., Heo J.S., Choi S.H., Choi D.W., Kim S., Lee J.K., Lee S.Y.:
“*Serum CA19-9, cathepsin D, and matrix metalloproteinase-7 as
a diagnostic panel for pancreatic ductal adenocarcinoma*”. Proteomics.
2012, 12(23-24):3590-3597.
69. Partyka R., Sandelewski A., Łobejko I., Kocot J., Jałowiecki P.,
Kokocińska D.: „*Przydatność oznaczeń rozpuszczalnego fragmentu
cytokeratyny 18., antygenu karcynoembrionalnego oraz mucyno
pochodnego antygenu (CA 19-9) w diagnostyce chorych na raka
okrężnicy i odbytnicy*”. Pol. Merk. Lek., 2010, 29, 170, 128.
70. Pelzer U., Hilbig A., Sinn M., Stieler J., Bahra M., Dörken B., Reiss H.:
“*Value of carbohydrate antigen 19-9 in predicting response an therapy
control in patients with metastatic pancreatic cancer undergoing first-line
therapy*.” Front. Oncol. 2013, 3:155.
71. Pezzilli R., Casadei R., Calculli L., Santini D., Morselli-Labate A.M.;
NeoPan Study Group.: “*Serum determination of CA 19-9 in diagnosing
pancreatic cancer: an obituary*”. Dig. Liver Dis. 2010, 42(1):73-74.
72. Pezzilli R., Fabbri D., Imbrogno A.: „*Pancreatic ductal adenocarcinoma
screening: new perspectives*.” World J Gastroenterol. 2012, 16(36):4973-
4977.
73. Polesel J., Talamini R., Negri E., Bosetti C., Boz G., Lucenteforte
E., Franceschi S., Serraino D., La Vecchia C.: “*Dietary habits and risk of
pancreatic cancer: an Italian case-control study*”. Cancer Causes
Control. 2010, 21(4):493-500.
74. Rudnicki J., Agrawal A.K., Grzebieniak Z., Zukrowski P., Zyśko D., Jelen
M., Kielan W., Sebastian M., Słonina J., Marek G., Duda-Barcik Ł.:
„*Prognostic value of CA 19-9 level in resectable pancreatic
adenocarcinoma*”. Folia Histochem. Cytobiol. 2010, 48(2):249-261.

75. Scarpa A., Capelli P., Mukai K., Zamboni G., Oda T., Iacono C., Hirohashi S.: *"Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations"*. Am. J. Pathol. 1993, 142(5):1534–1543.
76. Schmidt C.: *"Early detection tools for pancreatic cancer"*. J. Natl. Cancer Inst. 2012, 104(15):1117-1118.
77. Schramm H., Urban H., Arnold F., Penzlin G., Bosseckert H.: *"Intrasurgical pancreas cytology"*. Pancreas 2002, 24(2):210-214.
78. Shin S.H., Kim S.C., Hong S.M., Kim Y.H., Song K.B., Park K.M., Lee Y.J.: *"Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival"*. Pancreas. 2013, 42(2):216-222.
79. Siddiqui A.A., Kowalski T.E., Shahid H., O'Donnell S., Tolin J., Loren D.E., Infantolino A., Hong S.K., Eloubeidi M.A.: *"False-positive EUS-guided FNA cytology for solid pancreatic lesions"*. Gastrointest. Endosc. 2011, 74(3):535-540.
80. Siegel R., Naishadham D., Jemal A.: *"Cancer Statistics, 2012"*. CA Cancer J. Clin. 2012, 62(1):10–29.
81. Singh P., Srinivasan R., Wig J.D.: *"Major molecular markers in pancreatic ductal adenocarcinoma and their roles in screening, diagnosis, prognosis, and treatment"*. Pancreas. 2011, 40(5):644-652.
82. Sivarman A., Muthukrishnan A., Boopathy Senguttavan N., Anil Suchak S., Kannan U.: *"Predictors of malignancy in pancreatic head mass: a prospective study"*. Pan. Afr. Med J. 2011, 9;30.
83. Snarska J., Puchalski Z., Szajda S.D., Hady R.H., Kamiński F., Dadan J.: *"Rak a ostre zapalenie trzustki – opis przypadków"*. Pol. Merk. Lek. 2007, 23, 136, 276-279.
84. Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W., Villee C.A.: *"Biologia"*. MULTICO Oficyna Wydawnicza, W-wa, 1998, 911-936 .
85. Stadnik H., Brzuzgo K., Szymeja J., Janicka-Jedyńska M., Majewski P., Drews M.: *"Ocena wartości diagnostycznej i rokowniczej przedwunastniczej biopsji cienkoigłowej u chorych z guzami głowy trzustki w materiale Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej"*

- i Endokrynologicznej UM w Poznaniu*". Pol. Prz. Chir. 2010, 82(11), 1049-1056.
86. Strimpakos A.S., Syrigos K.N., Saif M.W.: *"The molecular targets for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer"*. Gut Liver. 2010, 4(4): 433–449.
87. Szajda S.D., Waszkiewicz N., Chojnowska S., Zwierz K.: *"Carbohydrate markers of pancreatic cancer"*. Biochem. Soc. Trans. 2011, 39(1):340-343.
88. Takeuchi H., Kawano T., Toda T., Minamisono Y., Nagasaki S., Yao T., Sugimachi K.: *"Cutaneous metastasis from pancreatic adenocarcinoma: a case report and a review of the literature"*. Hepatogastroenterology. 2003, 50(49):275-277.
89. Talamini R., Polesel J., Gallus S., Dal Maso L., Zucchetto A., Negri E., Bosetti C., Lucenteforte E., Boz G., Franceschi S., Serraino D., La Vecchia C.: *"Tobacco smoking, alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study in Italy"*. Eur. J. Cancer. 2010, 46(2):370-376.
90. Tramacere I., Scotti L., Jenab M., Bagnardi V., Bellocco R., Rota M., Corrao G., Bravi F., Boffetta P., La Vecchia C.: *"Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation"*. Int. J. Cancer. 2010, 126(6):1474-1486.
91. Tranah G.J., Holly E.A., Wang F., Bracci P.M.: *"Cigarette, cigar and pipe smoking, passive smoke exposure, and risk of pancreatic cancer: a population-based study in the San Francisco Bay Area"*. BMC Cancer. 2011, 11:138.
92. Vainshtein JM., Schipper M., Zalupski MM., Lawrence TS., Abrams R., Francis IR., Khan G., Leslie W., Ben-Josef E.: *"Prognostic significance of carbohydrate antigen 19-9 in unresectable locally advanced pancreatic cancer treated with dose-escalated intensity modulated radiation therapy and concurrent full-dose gemcitabine: analysis of a prospective phase 1/2 dose escalation study"*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2013, 1;86(1):96-101.

93. Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, Martinez A, Erill N, Lerma E, Farre A, Lluís F, Capella G.: *“Diagnostic utility of K-ras mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses”*. Gastroenterology. 1996, 110(5): 1587-1594.
94. Vincent A., Herman J., Schulick R., Hruban RH., Goggins M.: *“Pancreatic cancer”*. Lancet. 2011, 378(9791):607-620.
95. Wingren C., Sandström A., Segersvärd R., Carlsson A., Andersson R., Löhr M., Borrebaeck C.A.: *“Identification of serum biomarker signatures associated with pancreatic cancer”*. Cancer Res. 2012, 72(10):2481-2490.
96. Winter J.M., Yeo C.J., Brody J.R.: *“Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer”*. J. Surg. Oncol. 2013, 107(1):15-22.
97. Wong D., Ko A.H., Hwang J., Venook A.P., Bergsland E.K., Tempero M.A.: *“Serum CA19-9 decline compared to radiographic response as a surrogate for clinical outcomes in patients with metastatic pancreatic cancer receiving chemotherapy”*. Pancreas. 2008, 37(3):269-274.
98. Woyke S., Olszewski W.: *„Cytodiagnostyka aspiracyjna nowotworów”*. PZWL, Warszawa, 1979, 15-19.
99. Xu Q., Zhang TP., Zhao YP.: *“Advances in early diagnosis and therapy of pancreatic cancer”*. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 2011, 10(2):128-135.
100. Yamao K., Sawaki A., Mizuno N., Shimizu Y., Yatabe Y., Koshikawa T.: *“Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB): past, present, and future”*. J. Gastroenterol. 2005, 40(11):1013–1023.
101. Yang RY., Ng D., Jaskolka JD et al.: *„Evaluation of percutaneous ultrasound-guided biopsies of solid mass lesions of the pancreas: a center’s 10-year experience”*. Clin Imaging 2015, 39: 62-65.
102. Yue T., Maupin KA., Fallon B., Li L., Partyka K., Anderson MA., Brenner DE., Kaul K., Zeh H., Moser AJ., Simeone DM., Feng Z, Brand RE., Haab BB.: *“Enhanced discrimination of malignant from benign pancreatic disease by measuring the CA 19-9 antigen on specific protein carriers”*. PLoS One. 2011, 6(12):e29180.

103. Yue T., Partyka K., Maupin KA., Hurley M., Andrews P., Kaul K., Moser AJ., Zeh H., Brand RE., Haab BB.: *"Identification of blood-protein carriers of the CA 19-9 antigen and characterization of prevalence in pancreatic diseases"*. Proteomics. 2011, 11(18):3665-3674.
104. Yusuf TE., Ho S., Pavey DA., Michael H., Gress FG.: *"Retrospective analysis of the utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) in pancreatic masses, using a 22-gauge or 25-gauge needle system: a multicenter experience"*. Endoscopy. 2009, 41(5):445-448.
105. Zamboni GA, D'Onofrio M., Indili A. et al.: *"Ultrasound-Guided Percutaneous Fine-Needle Aspiration of 545 Focal Pancreatic Lesions"*. AJR 2009, 193: 1691-1695.
106. Zhang S., Wang Y.M., Sun C.D., Lu Y., Wu L.Q.: *"Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma"*. World J. Gastroenterol. 2008, 14(23): 3750–3753.
107. Zhao S., Wang Y., Cao L., Ouellette MM., Freeman JW.: *"Expression of oncogenic K-ras and loss of Smad4 cooperate to induce the expression of EGFR and to promote invasion of immortalized human pancreas ductal cells"*. Int. J. Cancer. 2010, 127(9):2076-2087.
108. Zubarik R., Gordon SR., Lidofsky SD., Anderson SR., Pipas JM., Badger G., Ganguly E., Vecchio J.: *"Screening for pancreatic cancer in a high-risk population with serum CA 19-9 and targeted EUS: a feasibility study"*. Gastrointest Endosc. 2011, 74(1):87-95.

9. SPIS TABEL

Tabela 1: Podział przypadków ze względu na wynik badania cytologicznego biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej materiału pobranego z trzustki. Preparaty barwione hematoksyliną i eozyną.....	20
Tabela 2: Wyniki uzyskane po oznaczeniu markera nowotworowego CA 19-9 metodą immunohistochemiczną na materiale pobranym z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej.....	35
Tabela 3: Porównanie wyników otrzymanych w preparatach sporządzonych z materiału pobranego w trakcie BAC, wybarwionych hematoksyliną i eozyną z wynikami otrzymanymi w preparatach cytologicznych z BAC, w których oznaczono antygen CA 19-9 za pomocą reakcji ICC oraz ostatecznymi ustaleniami opartymi na wynikach cytologicznych, immunocytoologicznych, histopatologicznych, immunohistopatologicznych oraz opisach zabiegów operacyjnych.....	35

10. SPIS SCHEMATÓW

Schemat 1: Wyniki uzyskane w grupie I.....	23
Schemat 2: Wyniki uzyskane w grupie II.....	25
Schemat 3a: Wyniki uzyskane w grupie III.....	27
Schemat 3b: Wyniki uzyskane w grupie III.....	28
Schemat 4: Wyniki uzyskane w grupie IV.....	31

11. SPIS RYCIN

Rycina 1: Budowa immunoglobulin.....	12
Rycina 2: Reakcja immunocytochemiczna wykorzystująca metodę LSAB.....	16

12. STRESZCZENIE

Rak trzustki stanowi czwartą przyczynę śmierci w Stanach Zjednoczonych po raku płuc, gruczołu krokowego i piersi oraz jelita grubego. W USA stwierdza się około 22 tysięcy nowych zachorowań rocznie, spośród których mniej niż 5% pacjentów może spodziewać się 5-letniego przeżycia. Czynniki predysponującymi do zachorowania na ten nowotwór są nikotynizm, alkoholizm, wrodzone zapalenie trzustki oraz wiek pacjentów zwłaszcza pomiędzy 60 a 80 rokiem życia. Obecna diagnostyka raka trzustki wykorzystuje liczne dostępne techniki w celu uzyskania jak najbardziej dokładnego wyniku, mimo to nie istnieje specyficzny marker dla tego nowotworu. Z powodzeniem stosuje się biopsję aspiracyjną cienkoigłową oraz oznaczanie we krwi pacjenta m.in. stężenia antygenu CA 19-9. W dostępnym piśmiennictwie nie ma jednak informacji na temat zastosowania markera CA 19-9 na materiale pobranym z trzustki za pomocą BAC z wykorzystaniem technik immunocytochemicznych, co stało się przedmiotem moich dalszych badań.

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności badania immunocytochemicznego ekspresji CA 19-9 w rozmazach pobranych w trakcie BAC trzustki, a następnie porównanie otrzymanych rezultatów z wynikami badania cytologicznego, histopatologicznego oraz opisami zabiegów operacyjnych. Otrzymane rezultaty porównano z efektami prac innych naukowców dotyczących badanego zagadnienia. Do celów badawczych wykorzystano preparaty cytologiczne barwione metodą H+E lub MGG sporządzone w trakcie BAC trzustki. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano preparaty ze skrawkami guza jelita grubego. Preparaty histopatologiczne barwiono metodą H+E i poddawano ocenie. Skrawki przeznaczone do oznaczenia antygenu Ca 19-9 nanoszono na szkiełka pokryte substancją antypoślizgową i gotowano w celu odkrycia antygenów. Następnie przeprowadzano reakcję immunohistochemiczną analogicznie jak w przypadku reakcji immunocytochemicznej w preparatach cytologicznych. Dokumentację fotograficzną wykonano wykorzystując skaner DotSlide firmy Olympus oraz aparat fotograficzny firmy Olympus, model DP12.

W wyniku przeprowadzonej reakcji immunocytochemicznej w 156 preparatach otrzymano 114 rezultatów, które potwierdziły wynik analizy

cytologicznej. W kolejnych 28 preparatach pochodzących od pacjentów przydzielonych do grupy, w której postawienie ostatecznego rozpoznania cytologicznego było niemożliwe, uzyskano wyniki dodatnie oraz ujemne. W dalszym postępowaniu diagnostycznym 24 spośród nich zostały potwierdzone, trzy wyniki pozostały niewyjaśnione a w jednym uzyskano wynik fałszywie ujemny. W 10 przypadkach otrzymane wyniki reakcji antygen – przeciwciało były niezgodne z rozpoznaniem postawionym po analizie preparatów barwionych metodą H+E i także wymagały dalszej diagnostyki. W dziewięciu potwierdzono wynik reakcji ICC, natomiast jeden przypadek został uznany za ostatecznie niewyjaśniony. W trakcie prowadzenia badań z 3 preparatów spłynął materiał, natomiast w jednym przypadku po przeprowadzeniu reakcji ICC i przeanalizowaniu preparatu uznano, że ilość materiału jest zbyt skąpa i preparat jest niediagnostyczny.

Przeprowadzone przeze mnie badania wskazują, iż oznaczanie CA 19-9 w materiale pochodzącym z BAC trzustki ma znaczącą wartość w diagnostyce raka tego narządu. Metoda ta jest także przydatna w różnicowaniu stanu zapalnego od procesu nowotworowego trzustki. Dzięki zastosowanej technice postawiono ostateczne rozpoznanie w 146 przypadkach ze 152 badanych. Wprowadzenie metody ICC oznaczającej marker nowotworowy GICA w aspiratach z trzustki do rutynowej diagnostyki może przyczynić się do wykrywania gruczolaka tego narządu we wczesnym stadium, umożliwiając jednocześnie pełne wyleczenie pacjenta.

13. SUMMARY

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer-related death in the United States, right after cancer of the lungs, of the prostate and the breast as well as cancer of the large intestine. About twenty-two thousand patients are diagnosed yearly in the United States, of whom fewer than 5% may expect life expectancy longer than 5 years. Factors predisposing to pancreatic cancer are nicotine, alcoholism, congenital pancreatitis and the age of the patient, especially 60-80 years of age. Current diagnostics of the pancreatic cancer uses various techniques available in order to obtain a result as precise as possible. However, there is no specific marker for that type of cancer. Fine-needle aspiration biopsy and blood marking of, among others, concentration of CA 19-9 are used with success. Literature of the subject does not provide information on the use of CA 19-9 on sample material obtained from the pancreas through biopsy, using immunocytochemical techniques, which has become the subject of my further research.

The aim of this paper was to evaluate the usefulness of immunocytochemical examination of CA 19-9 expression in films taken during biopsy of the pancreas, and subsequently to compare the results obtained with the results of the cytological and histological examination and with description of operations. The results obtained were compared with the results of other scientists' research on this problem. For the needs of the research, cytological preparations H+E and MGG coloured, prepared during the biopsy of the pancreas were used. Preparations with patches of the tumor of the large intestine were used as positive control. Histological preparations were H+E coloured and evaluated. Patches used to mark CA 19-9 were moved to slides covered with anti-slippery layer and boiled in order to find antigens. Next, immunohistochemical reaction was carried out analogically to immunocytochemical reaction in cytological preparations. Photographic documentation was done using Olympus DotSlide scanner and Olympus DP12 photo camera.

As a result of the immunocytochemical reaction, out of 156 preparations, 114 results were obtained which confirmed the result of the cytological analysis. For another 28 preparations from patients for whom definite diagnosis was

impossible based on cytological examination, both positive and negative results were obtained. Further diagnostic procedure confirmed 24 of them, three cases remained unsolved and in one case a falsely negative result was obtained. In 10 cases the results of antigen-antibody reaction were incompatible with the diagnosis based on H+E coloured preparations and required further examination. In nine cases the result of ICC reaction was confirmed, one case remained unsolved. During the examination, the material slid away from 3 preparations, and in one case, after ICC reaction and analysis of the preparation, it was decided that the amount of material was insufficient and therefore the preparation was non-diagnosable.

The research I carried out proved that CA 19-9 marking in material from the biopsy of the pancreas is of significant value in the diagnosis of cancer of this organ. This method is also useful in differentiating the pancreatitis from a cancerous tumour of the pancreas. Thanks to the technique used, final diagnosis was given in 146 cases out of 152. Introduction of ICC method of GICA marking in aspirate of the pancreas material for routine diagnosis may help detect cancerous tumour of this organ at an early stage, thus enabling a full recovery of the patient.

DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

Fot. 1. Kontrola pozytywna dla badań IHC oraz ICC.

Preparat histopatologiczny wykonany ze skrawków guza jelita grubego, poddany reakcji immunohistochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji wyraźnie pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon oraz cytoplazmy komórek gruczołowych.

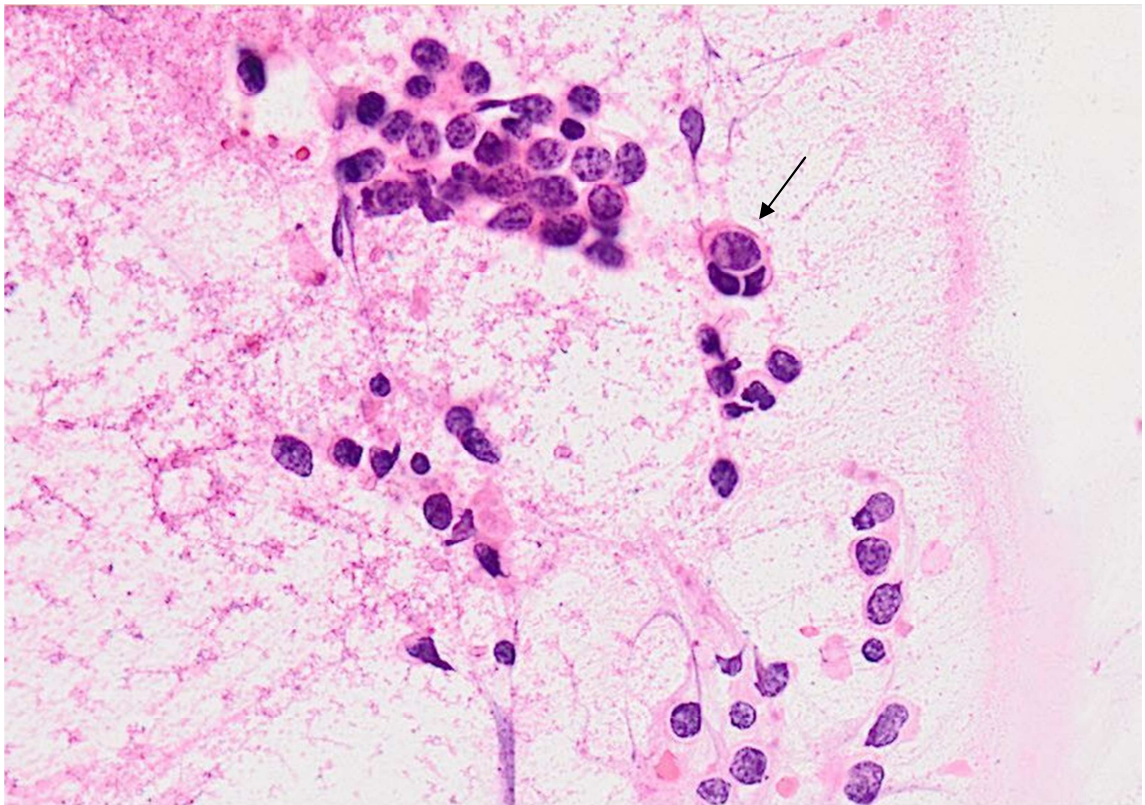
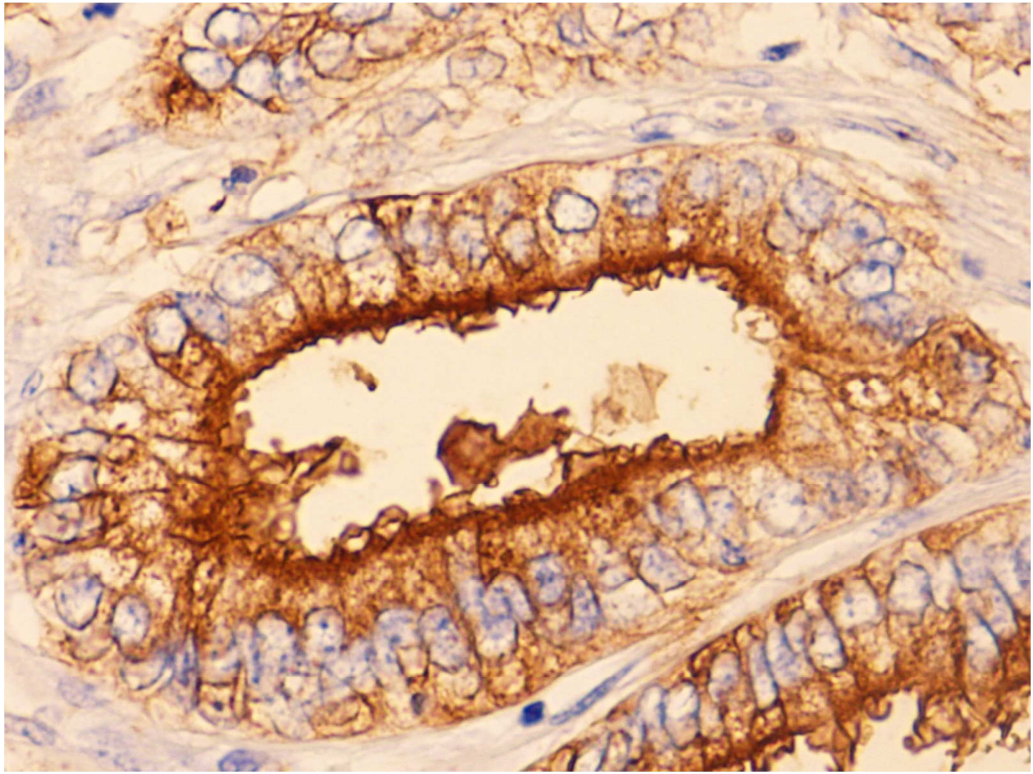
Pow. około 1000x

Fot.2. Grupa I, przypadek 31.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczne pojedyncze grupy komórek odpowiadające komórkom nowotworu neuroendokrynnego (↑).

Pow. około 400x



Fot. 3. Grupa I, przypadek 31.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

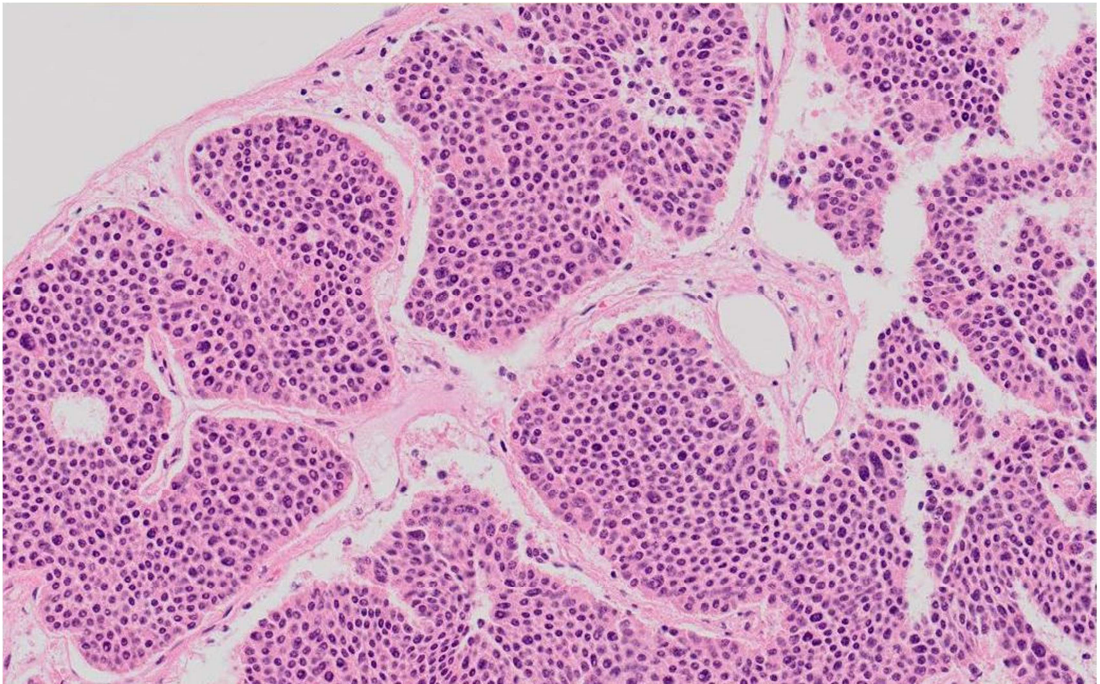
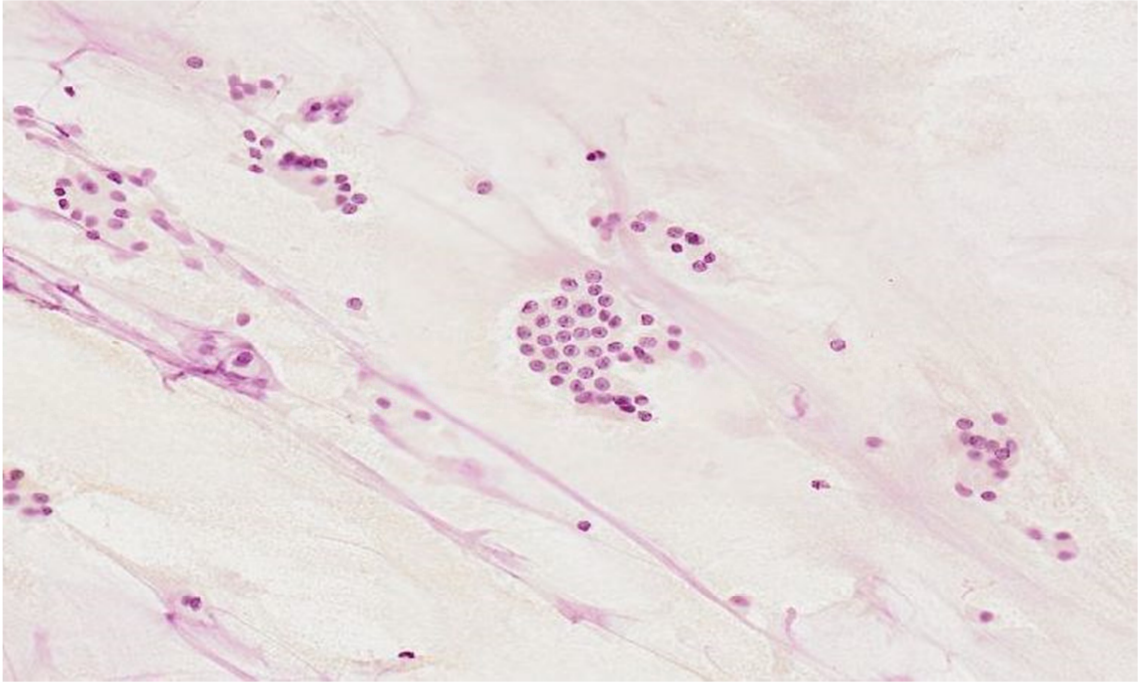
Wynik reakcji negatywny.

Pow. około 100x

Fot. 4. Grupa I, przypadek 31.

Preparat histopatologiczny wykonany ze skrawków guza wątroby, wybarwiony metodą H+E. W materiale obecny naciek guza neuroendokrynnego G1.

Pow. około 100x



Fot. 5. Grupa I, przypadek 31.

Preparat histopatologiczny wykonany ze skrawków guza wątroby, poddany reakcji immunohistochemicznej z oznaczeniem neuroendokrynnego białka wydzielniczego – chromograniny A.

Wynik reakcji pozytywny, potwierdzający obecność guza neuroendokrynnego G1.

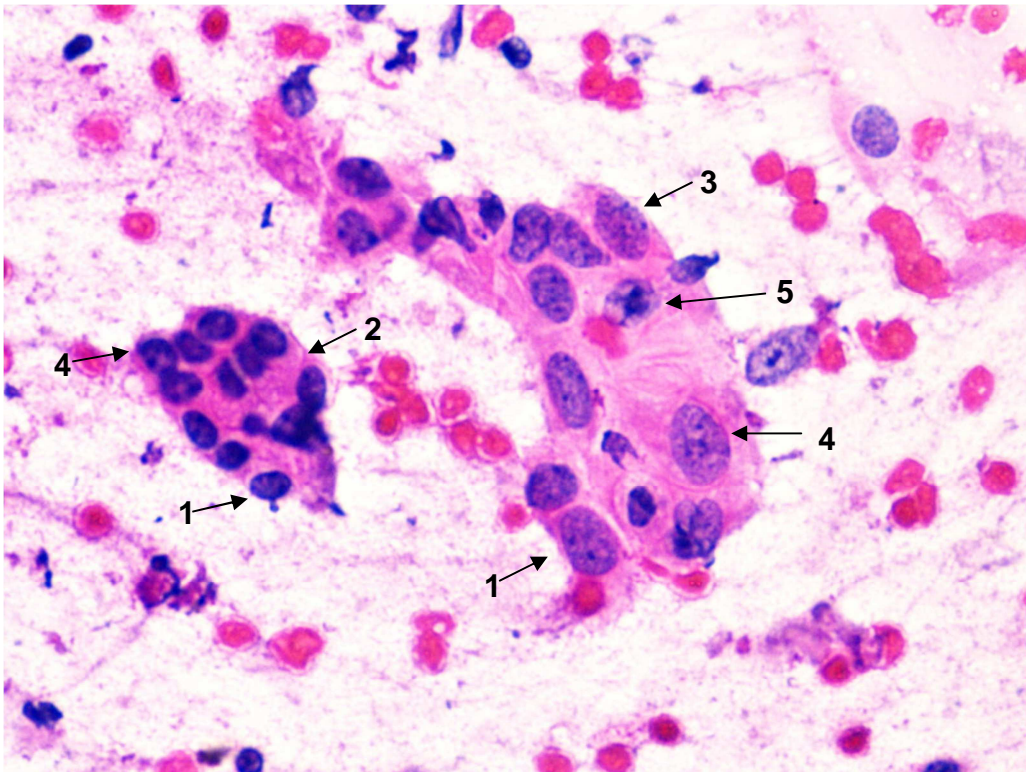
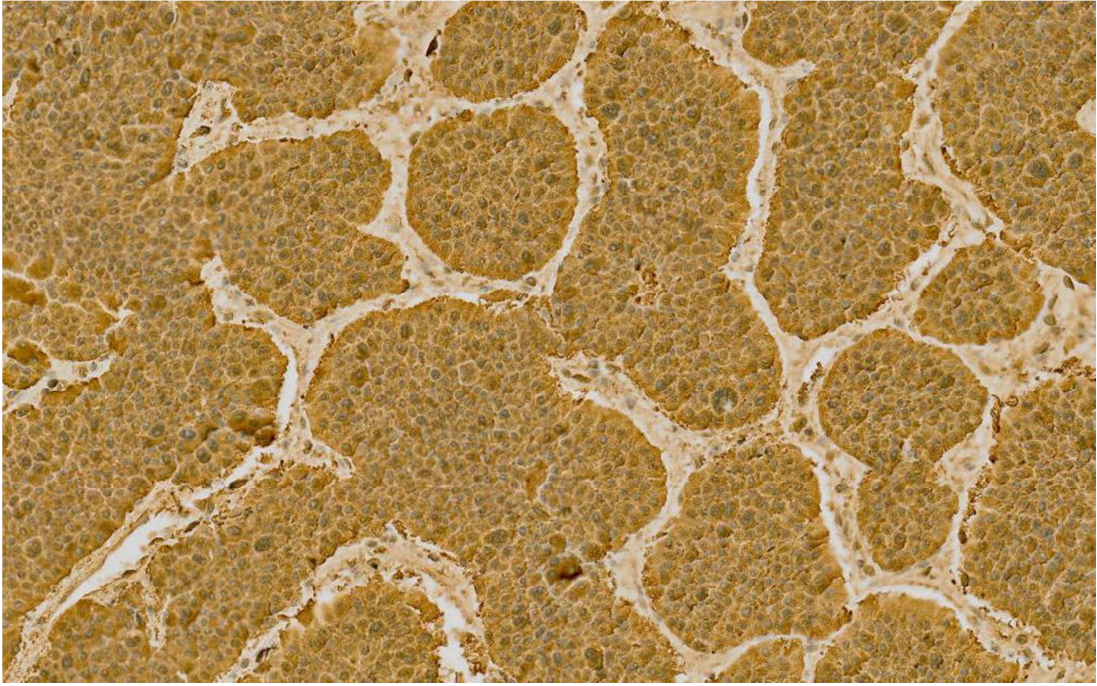
Pow. około 100x

Fot. 6. Grupa I, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczny znaczny polimorfizm komórek gruczołowych (1). Występują układy pęcherzykowe (2). Stosunek jądra do cytoplazmy przesunięty na korzyść jądra (3). Jądra komórkowe o różnej wielkości i kształcie, posiadają wyraźnie zaznaczoną chromatynę z widocznymi jąderkami (4) oraz wodniczki (5).

Pow. około 1000x



Fot. 7. Grupa I, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

Wynik reakcji wyraźnie pozytywny widoczny w postaci silnie wybarwionych na brązowo błon komórkowych (↑).

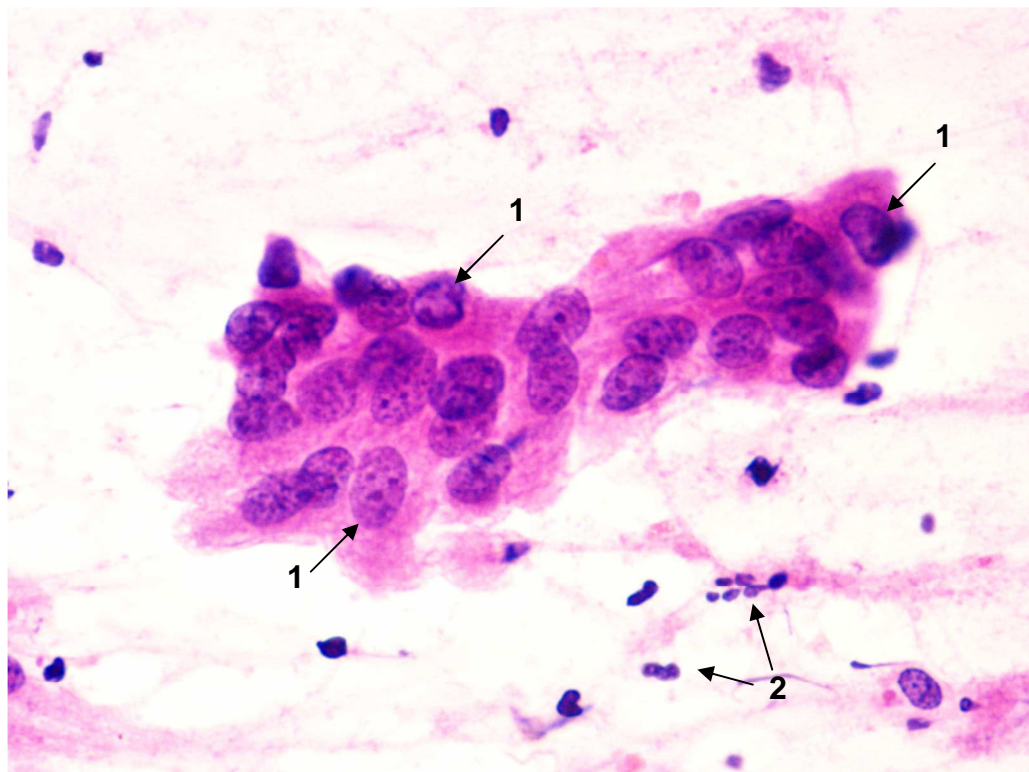
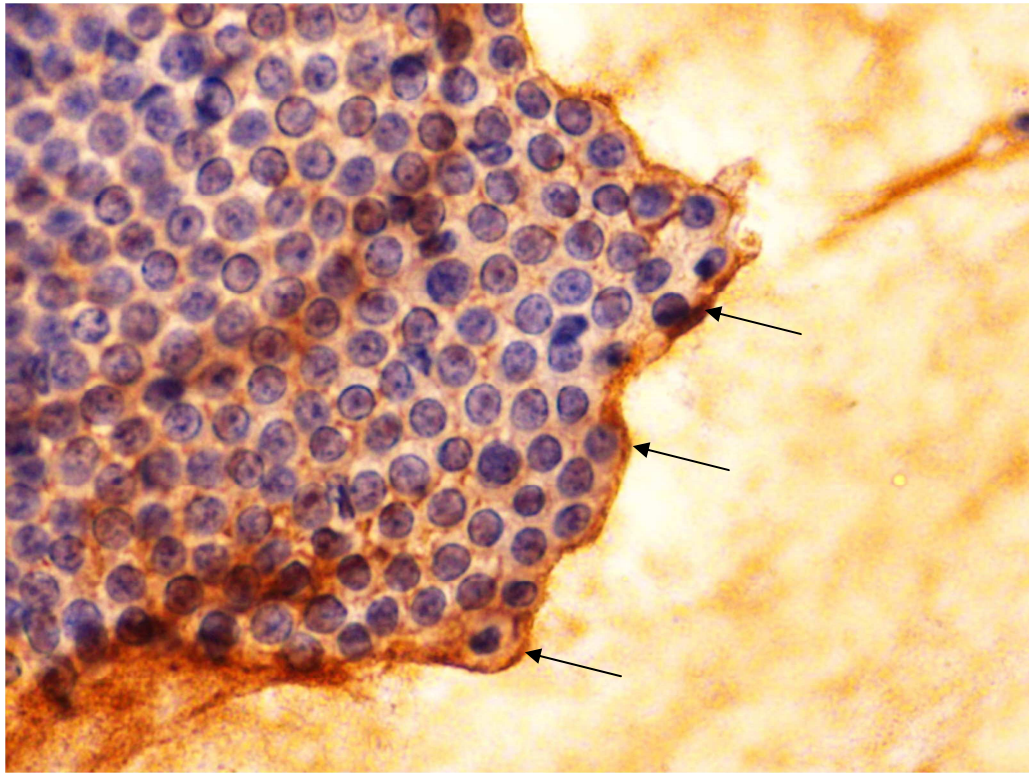
Pow. około 400x

Fot. 8. Grupa I, przypadek 50.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczna grupa komórek gruczołowych trzustki o nieprawidłowej budowie i nieregularnym układzie. Jądra komórkowe o różnej wielkości i kształcie z wyraźnie zaznaczoną chromatyną i widocznymi jąderkami (1). Występują limfocyty (2).

Pow. około 1000x



Fot. 9. Grupa I, przypadek 50.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

Wynik reakcji dodatni, słabo widoczny (↑).

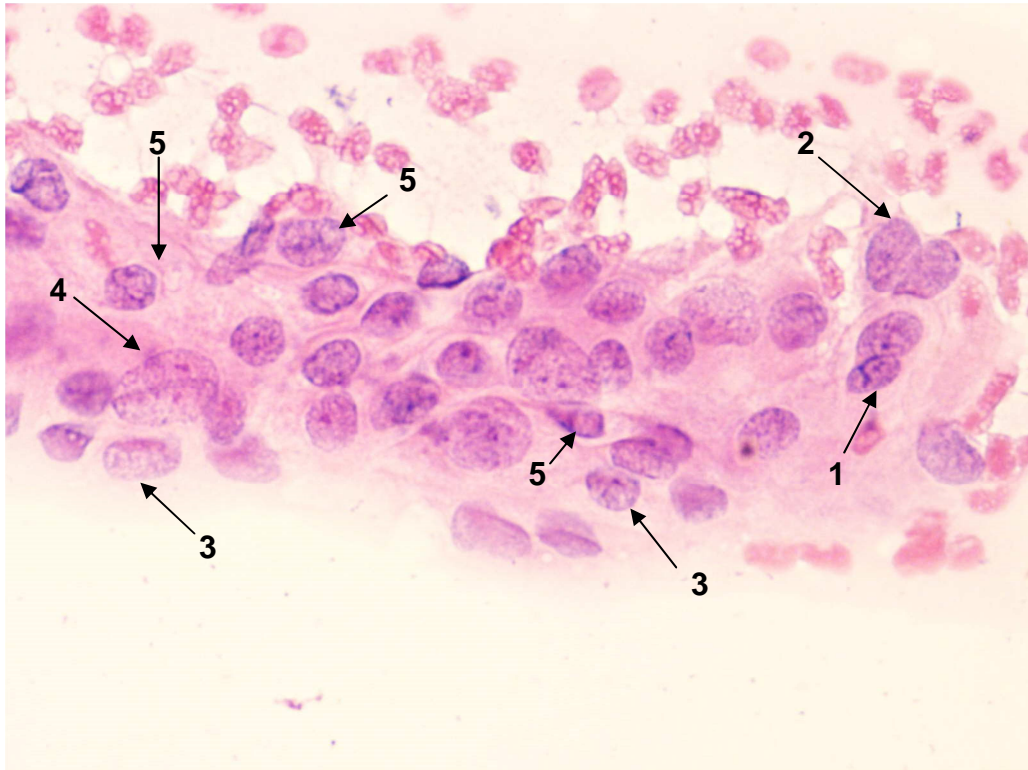
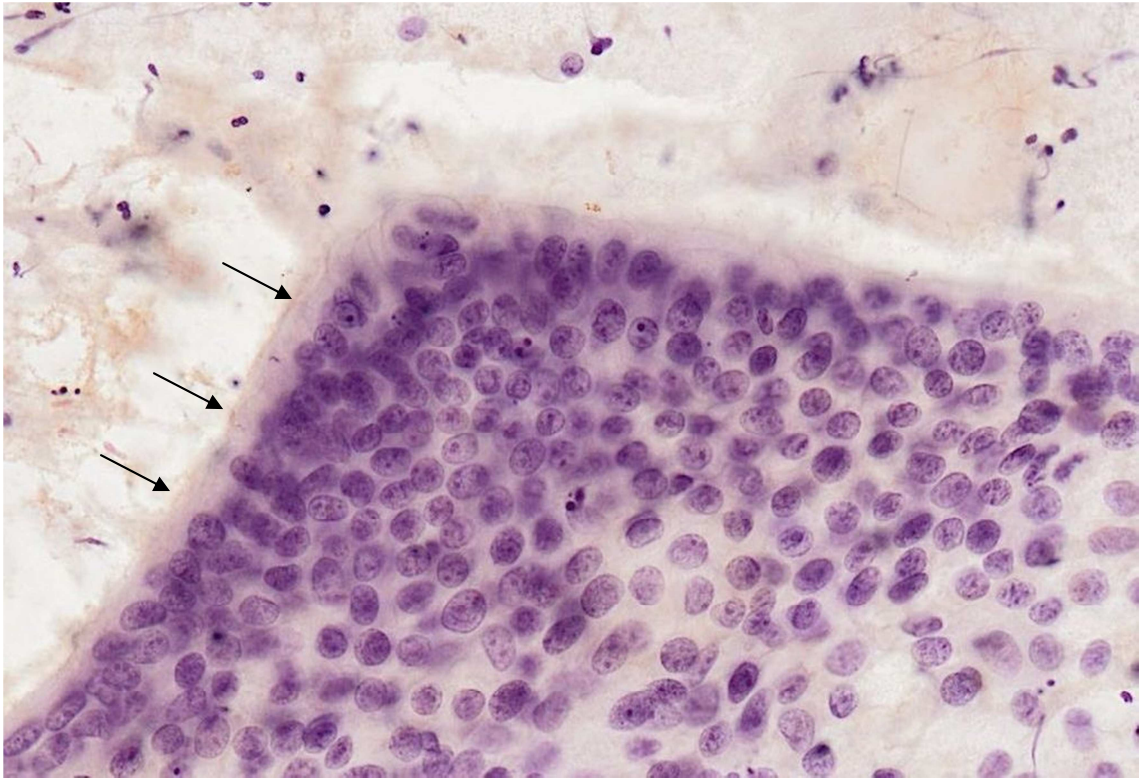
Pow. około 200x

Fot. 10. Grupa I, przypadek 49.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Fotografia przedstawia atypowe komórki gruczołowe trzustki. Po prawej stronie zdjęcia widoczna komórka dwujądrowa (1). Stosunek jądra do cytoplazmy przesunięty na korzyść jądra (2). Jądra komórkowe o zmiennej wielkości i kształcie z wyraźnie zaznaczoną, nieregularnie rozmieszczoną chromatyną oraz widocznymi jąderkami (3). W jednym jądrze widoczna bruzda (4). Zarówno w jądrach jak i w cytoplazmie występują wodniczki (5).

Pow. około 400x



Fot. 11. Grupa I, przypadek 49.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

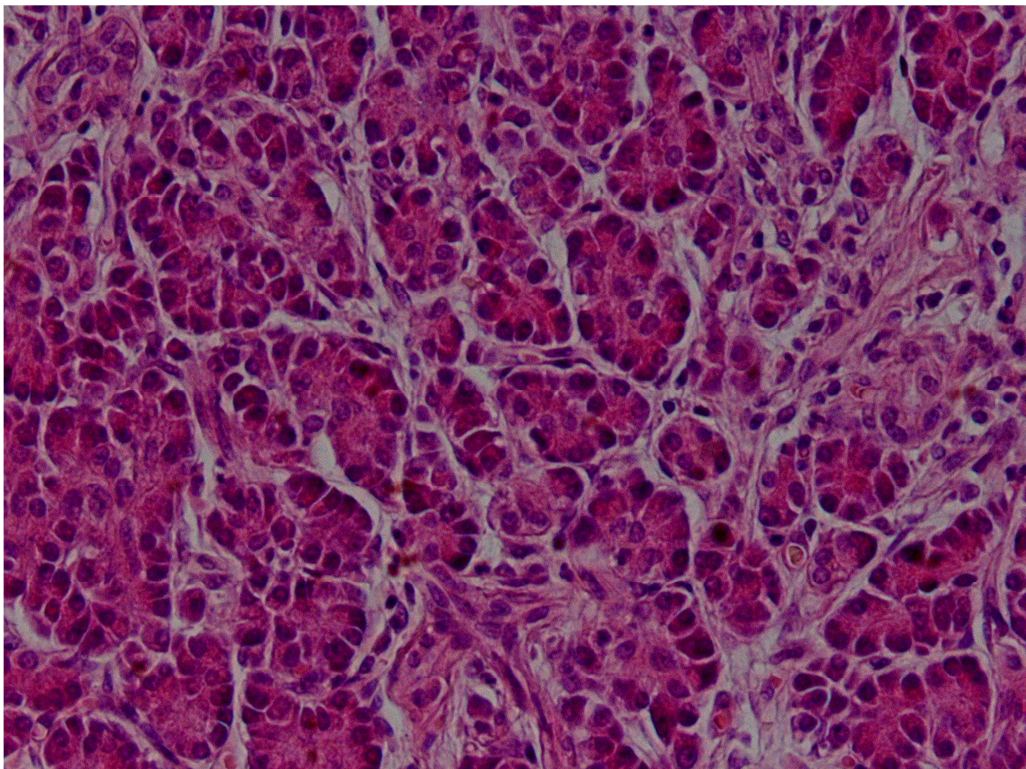
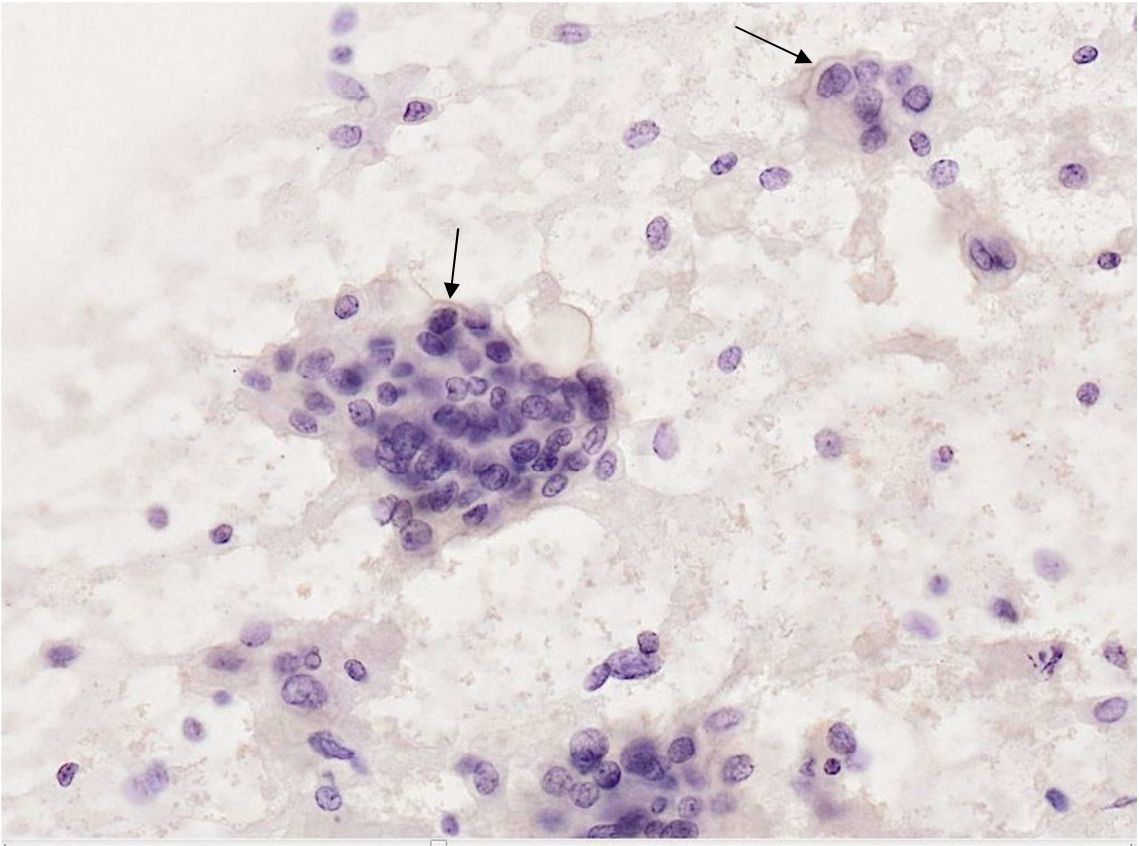
Wynik reakcji dodatni, słabo widoczny (↑).

Pow. około 200x

Fot. 12. Grupa I, przypadek 49.

Preparat histopatologiczny wykonany z materiału pobranego z guza trzustki, wybarwiony metodą H+E. Rozpoznanie histopatologiczne: *Adenocarcinoma pancreatis G1*.

Pow. około 400x



Fot. 13. Grupa I, przypadek 49.

Preparat histopatologiczny, sporządzony ze skrawków guza trzustki, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

Wynik reakcji wyraźnie pozytywny w postaci wybarwionych na brązowo błon oraz cytoplazmy komórek nowotworowych trzustki (↑).

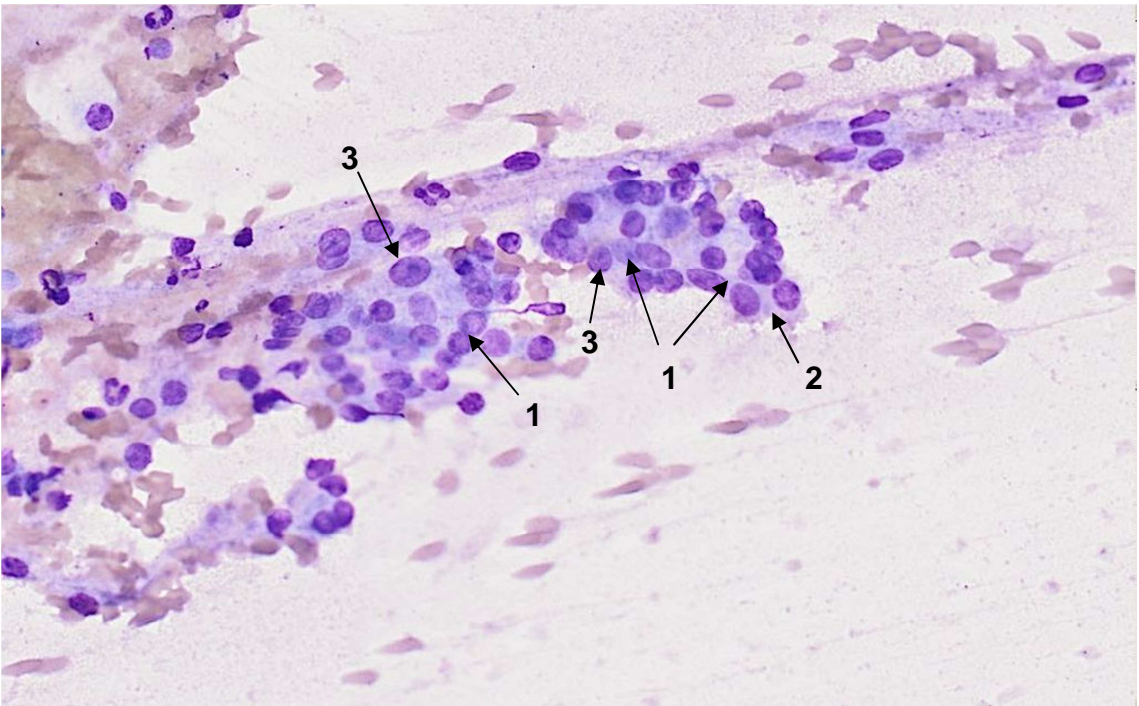
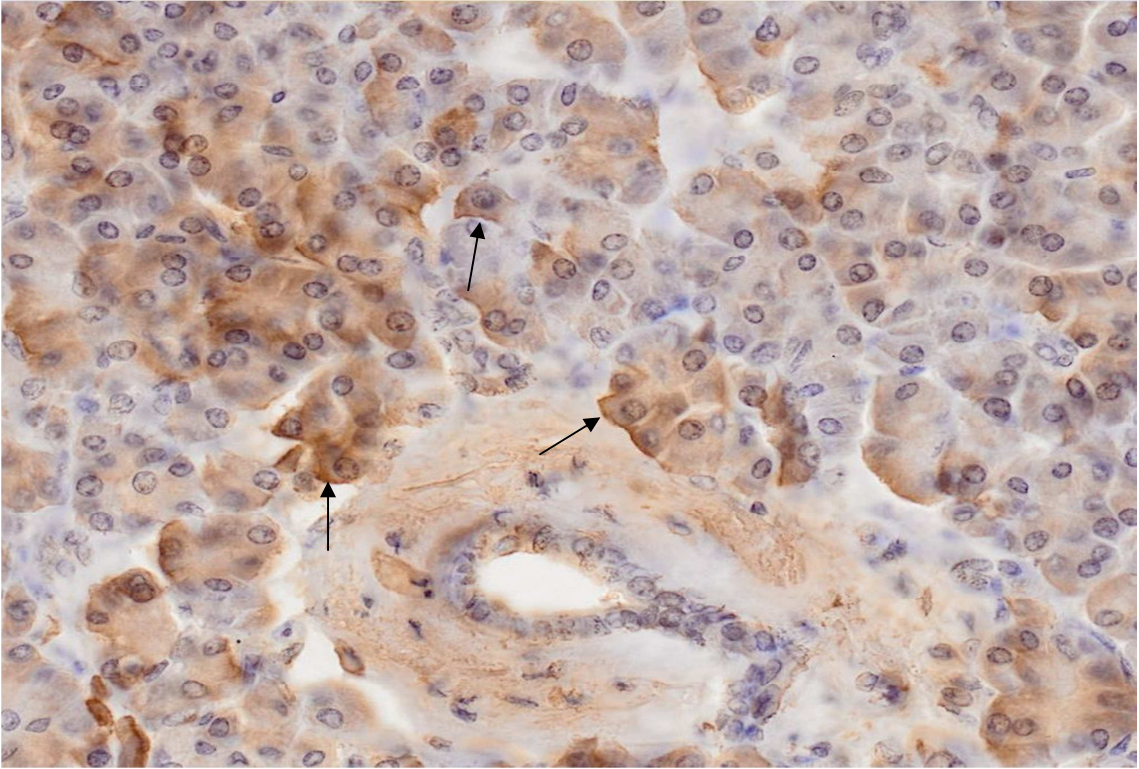
Pow. około 400x

Fot. 14. Grupa I, przypadek 19.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą MGG.

Widoczne atypowe komórki gruczołowe trzustki tworzące układy pęcherzykowe (1). Stosunek jądra do cytoplazmy przesunięty na korzyść jądra (2). Jądra komórek gruczołowych o różnej wielkości i nieregularnym kształcie z wyraźnie zaznaczonymi jąderkami (3).

Pow. około 200x



Fot. 15. Grupa I, przypadek 19.

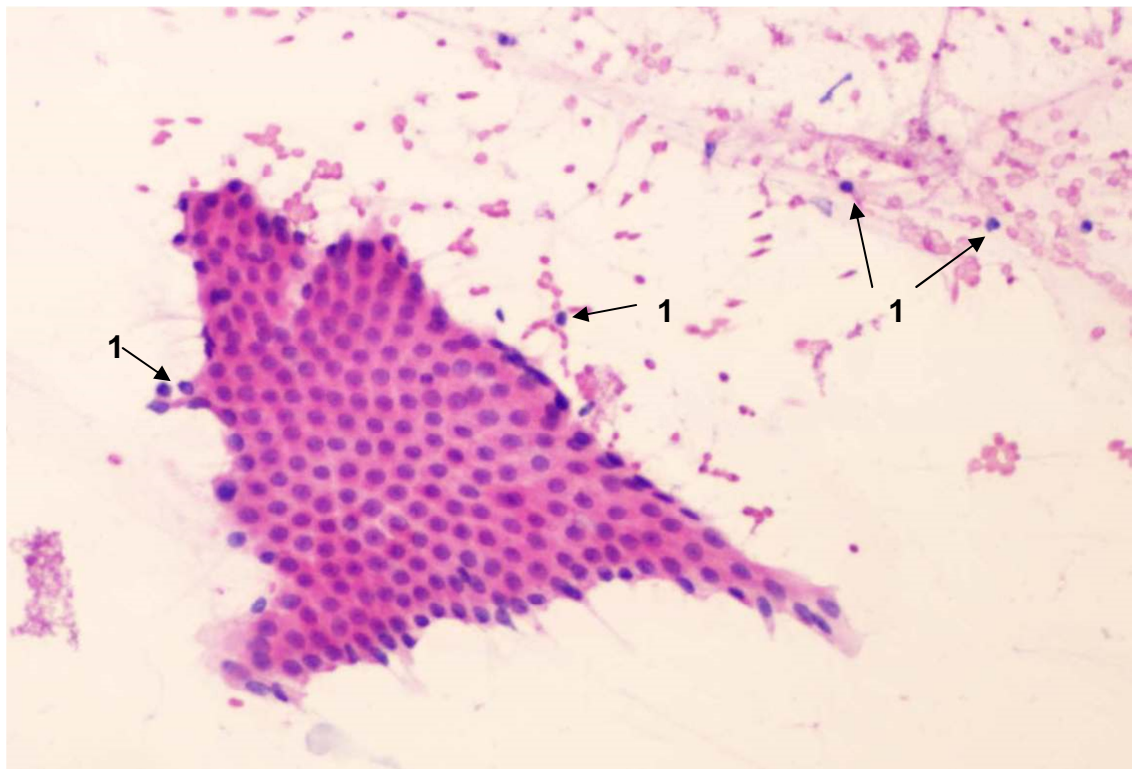
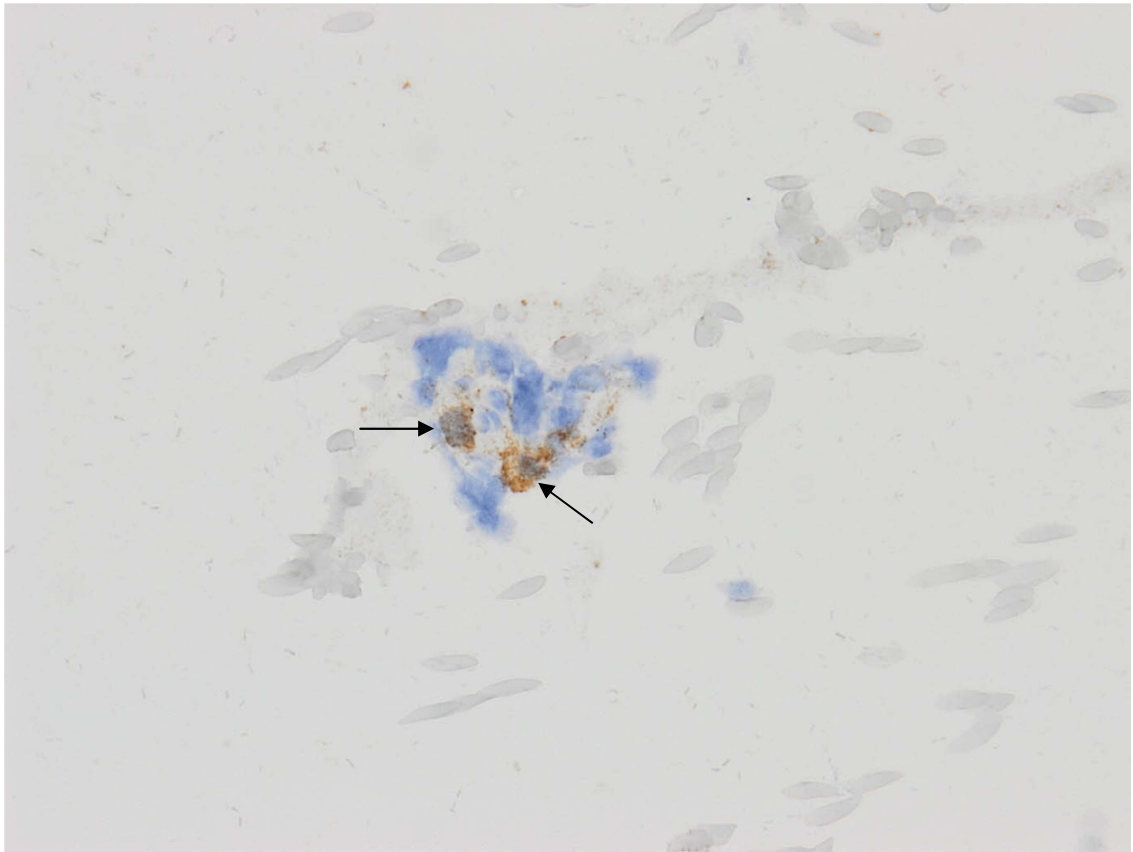
Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon komórek nowotworowych trzustki (↑).

Pow. około 200x

Fot. 16. Grupa II, przypadek 25.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E. Widoczny płat prawidłowych komórek gruczołowych trzustki oraz pojedyncze limfocyty (1).

Pow. około 100x



Fot. 17. Grupa II, przypadek 25.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji negatywny.

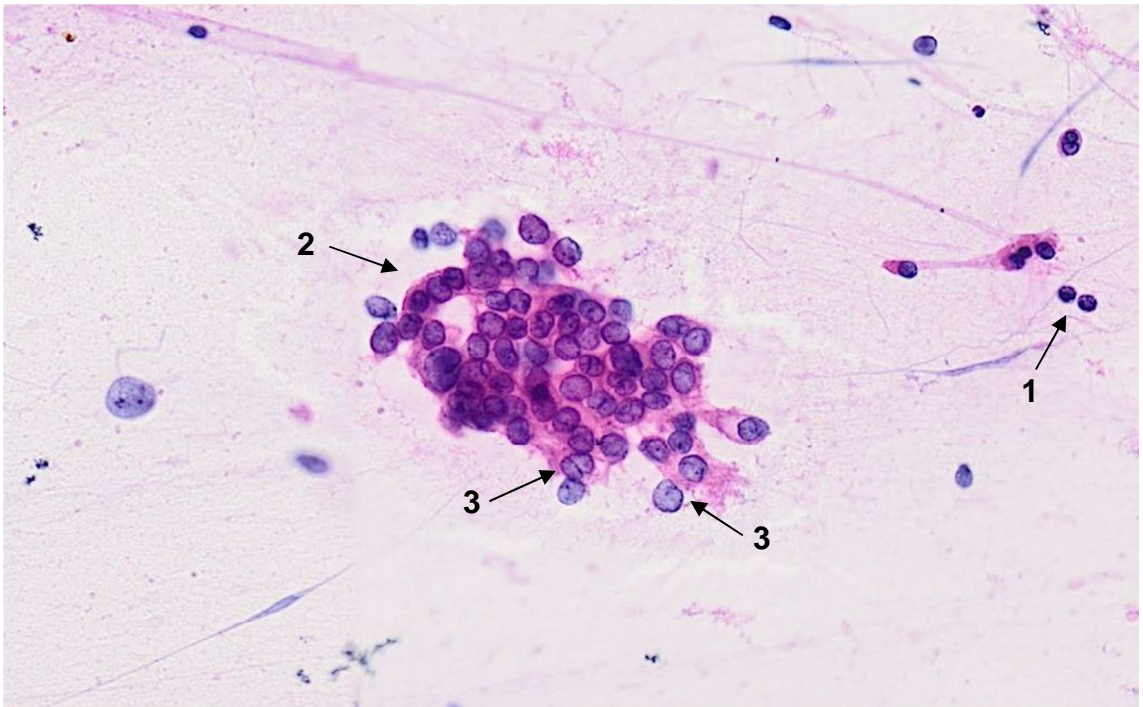
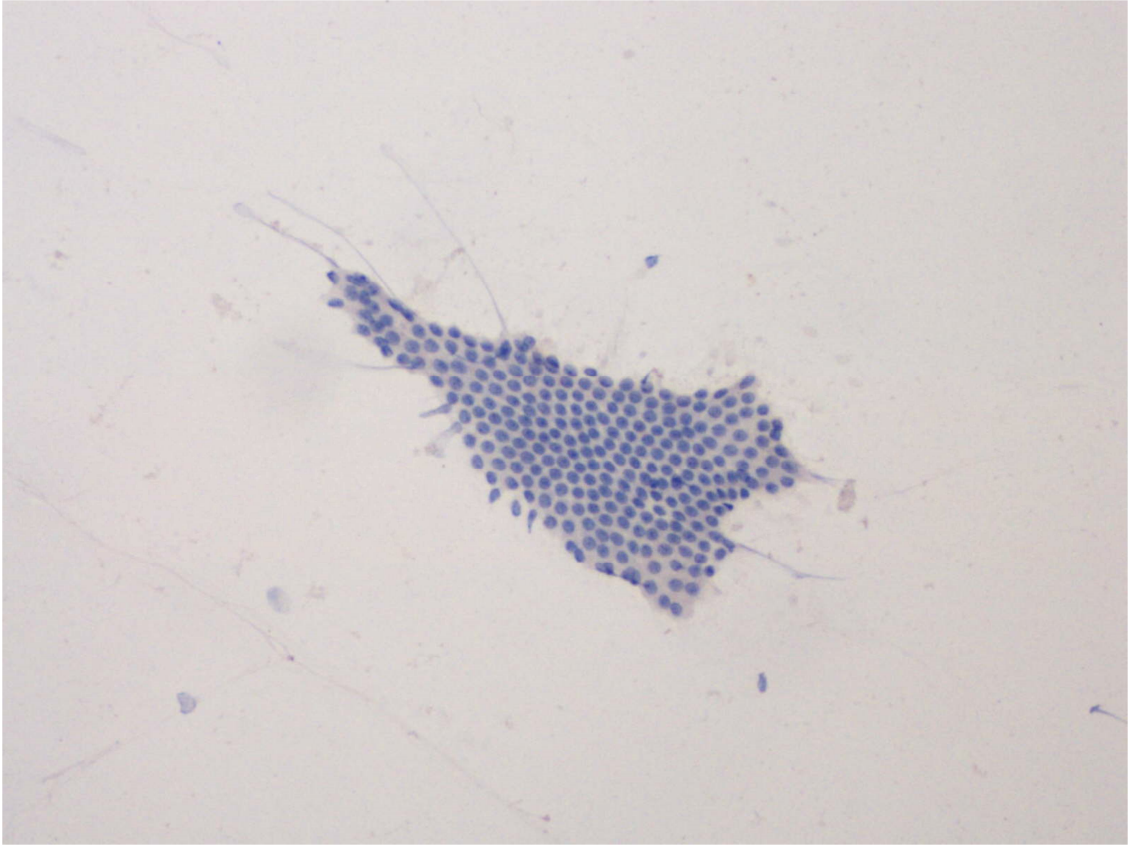
Pow. około 100x

Fot. 18. Grupa II, przypadek 21.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczna grupa komórek gruczołowych trzustki oraz pojedyncze limfocyty (1). Uwagę zwraca nieregularne rozmieszczenie komórek, utworzony układ pęcherzykowy (2) oraz widoczne bruzdy w jądrach (3).

Pow. około 200x



Fot. 19. Grupa II, przypadek 21.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji wyraźnie pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon komórek nowotworowych (↑).

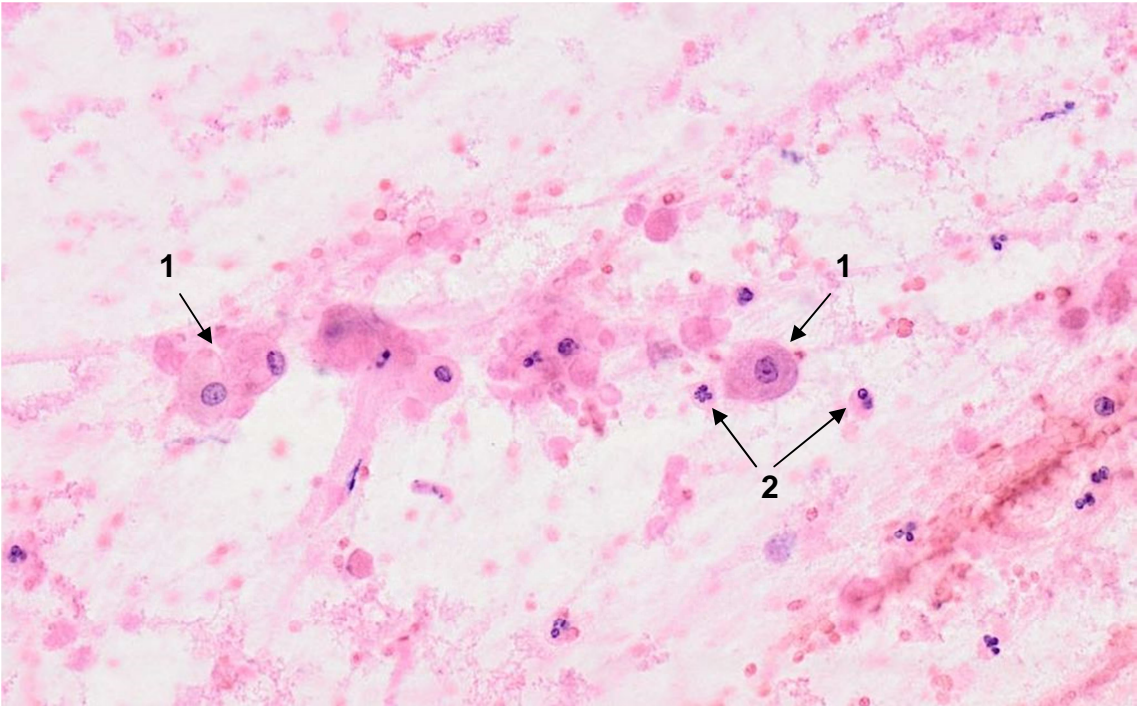
Pow. około 200x

Fot. 20. Grupa II, przypadek 29.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczne pojedyncze komórki gruczołowe trzustki z cechami odczynu zapalnego o stosunkowo dużych jądrach i widocznych jąderkach (1) oraz granulocyty obojętnochłonne (2).

Pow. około 200x



Fot. 21. Grupa II, przypadek 29.

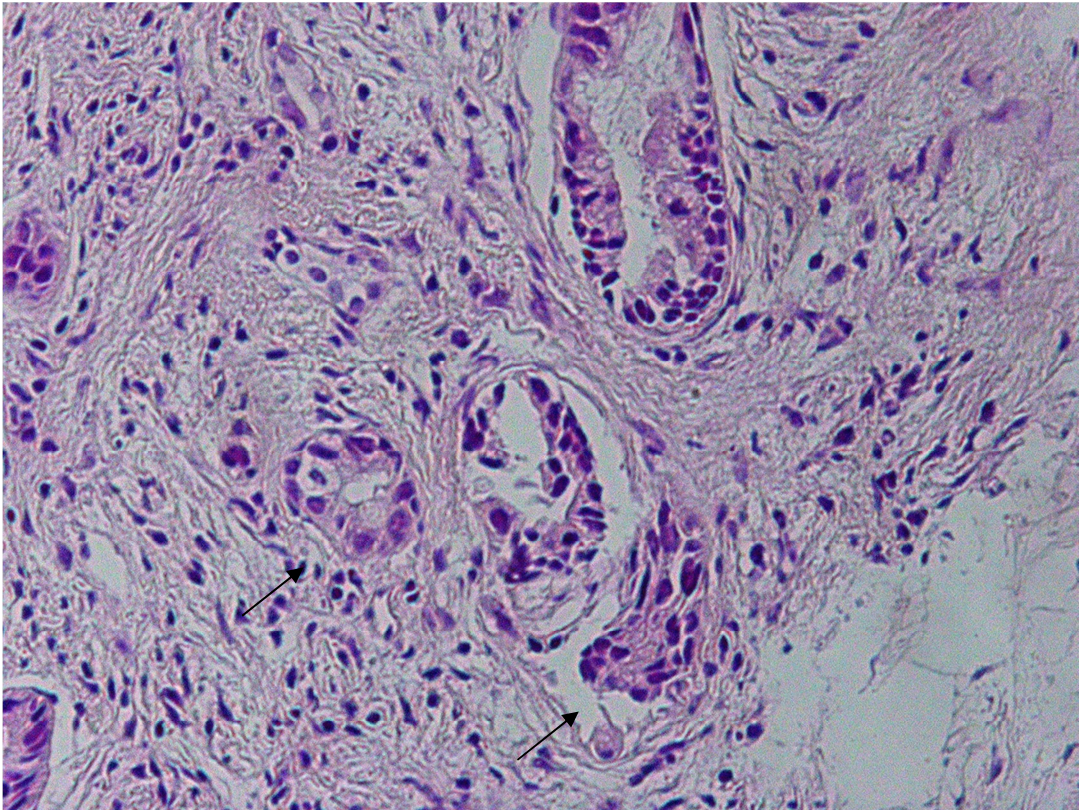
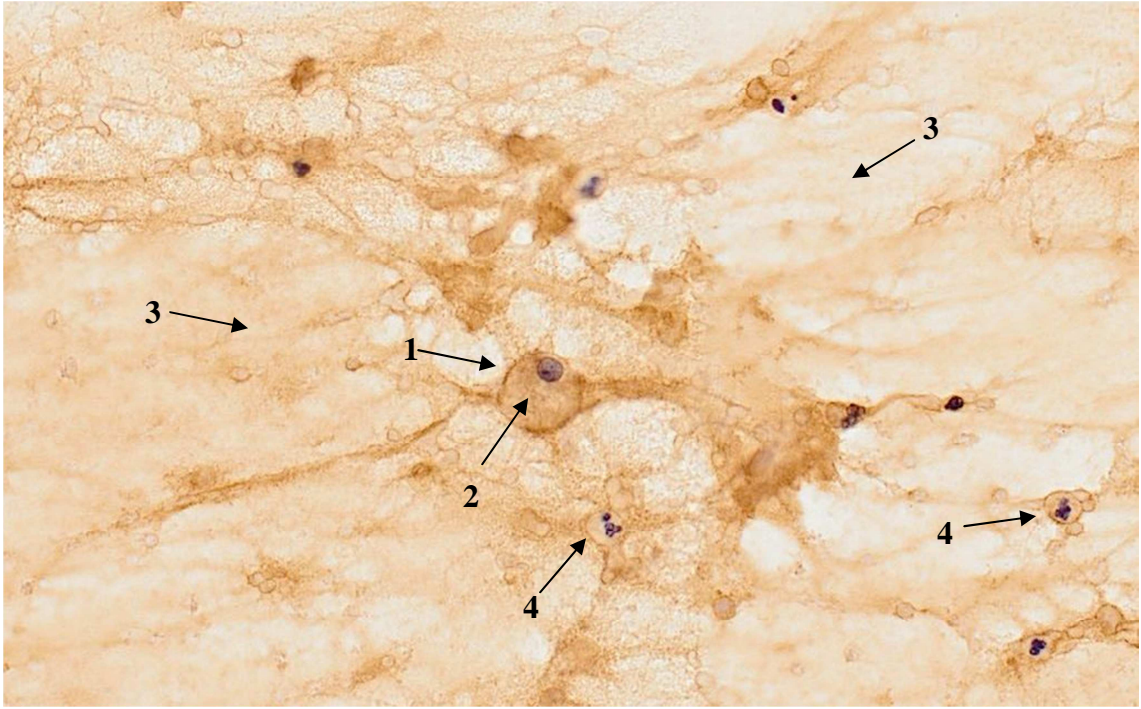
Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Widoczna silna reakcja dodatnia zarówno na powierzchni błony komórki gruczołowej trzustki (1) jak i w jej cytoplazmie (2) oraz w płynie otaczającym zaaspirowane komórki (3). Na fotografii widoczne są także granulocyty obojętnochłonne (4).

Pow. około 200x

Fot. 22. Grupa II, przypadek 29.

Preparat histopatologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki, wybarwiony metodą H+E. Widoczne zmiany odpowiadają komórkom raka gruczołowego trzustki (↑).

Pow. około 400x



Fot. 23. Grupa II, przypadek 30.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

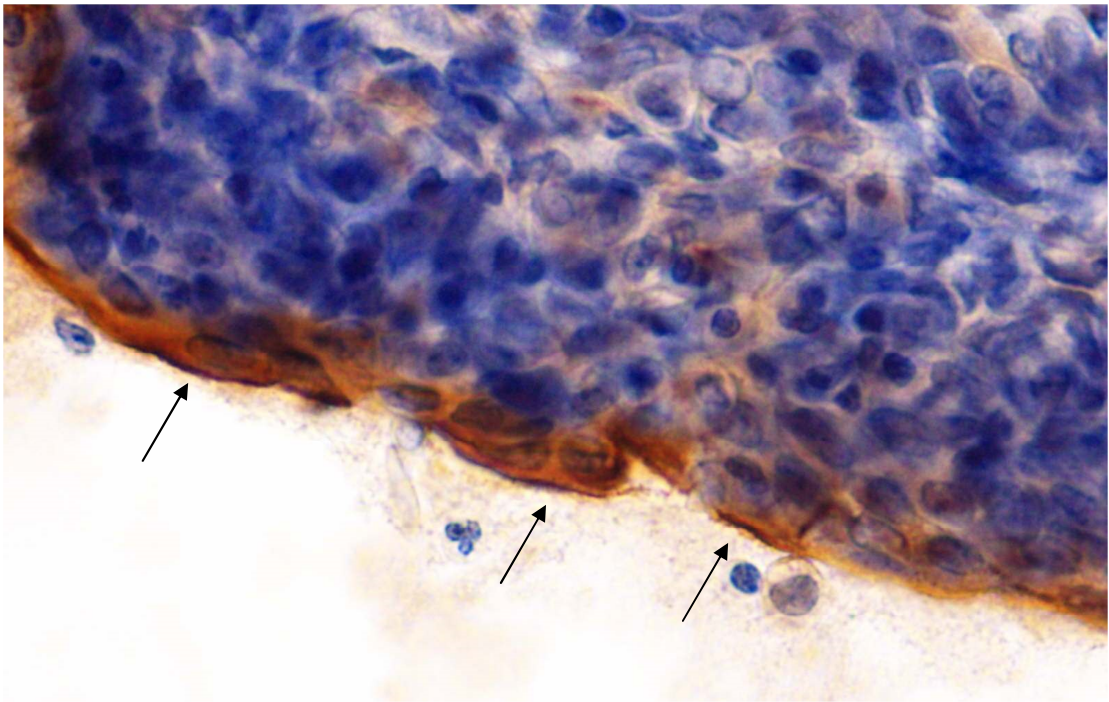
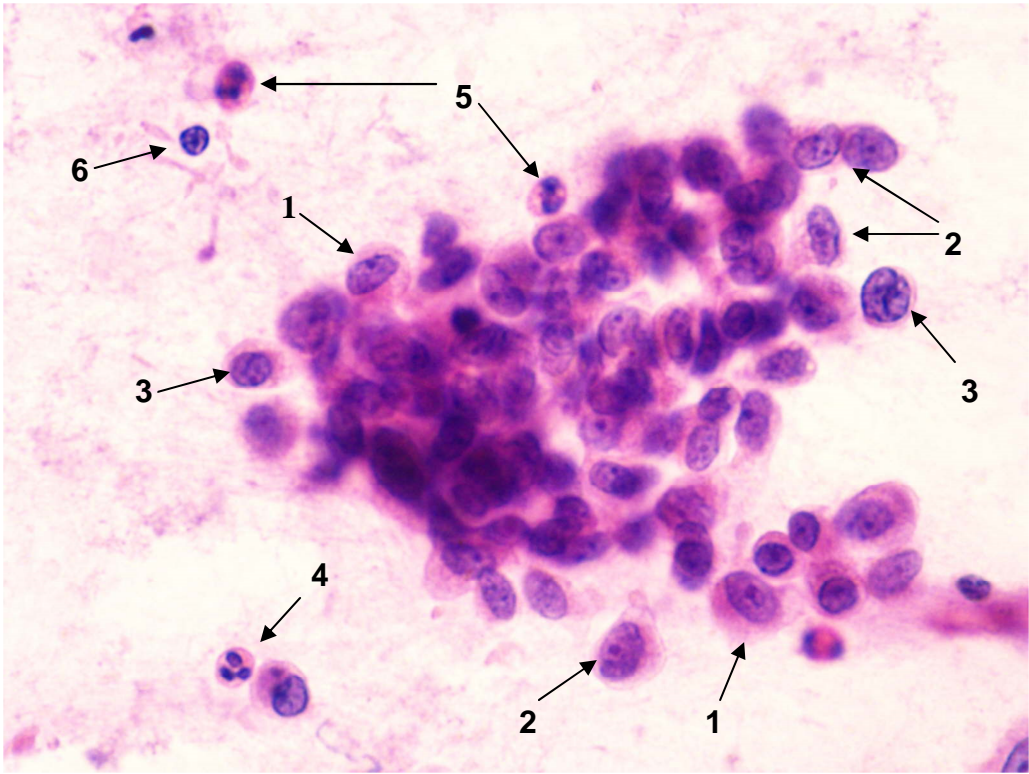
Widoczna grupa komórek gruczołowych trzustki z cechami atypii. Stosunek jądra komórkowego do cytoplazmy przesunięty na korzyść jądra (1). Jądra komórek nieregularne z zaznaczoną chromatyną oraz dużymi, widocznymi jąderkami (2). Uwagę zwracają bruzdy znajdujące się w jądrach komórek gruczołowych (3). Obecne są granulocyty obojętnochłonne (4), kwasochłonne (5) oraz limfocyty (6).

Pow. około 400x

Fot. 24. Grupa II, przypadek 30.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Widoczna wyraźna reakcja pozytywna potwierdzająca występowanie komórek raka trzustki (↑).

Pow. około 400x



Fot. 25. Grupa II, przypadek 30.

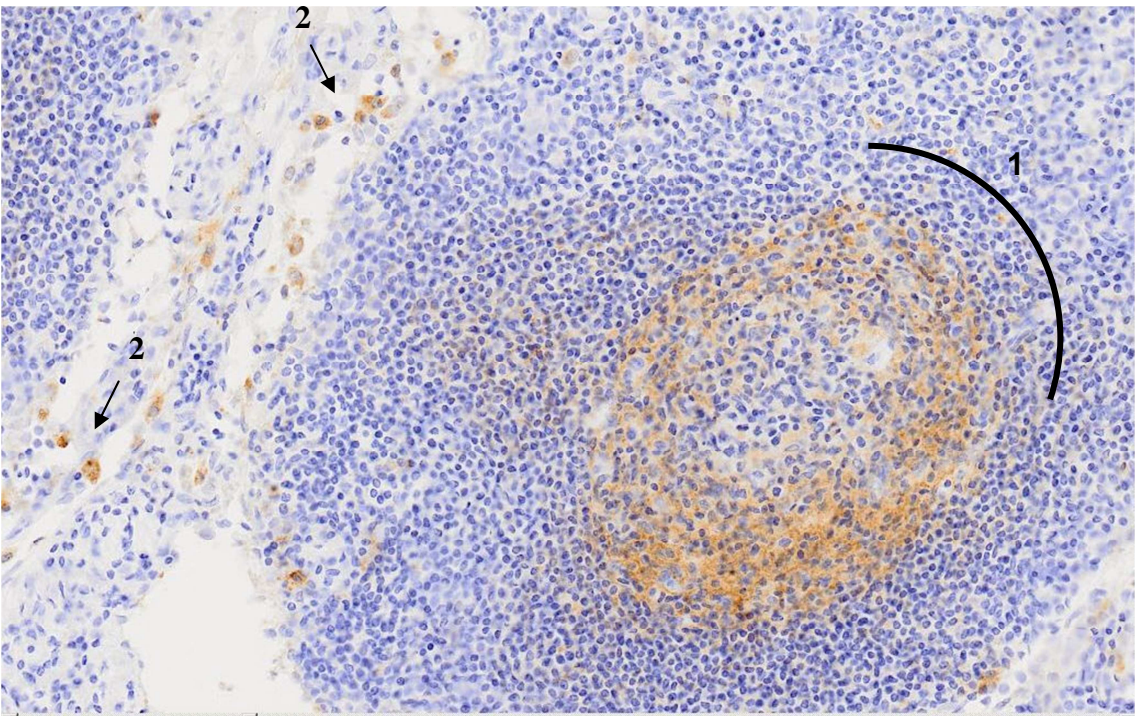
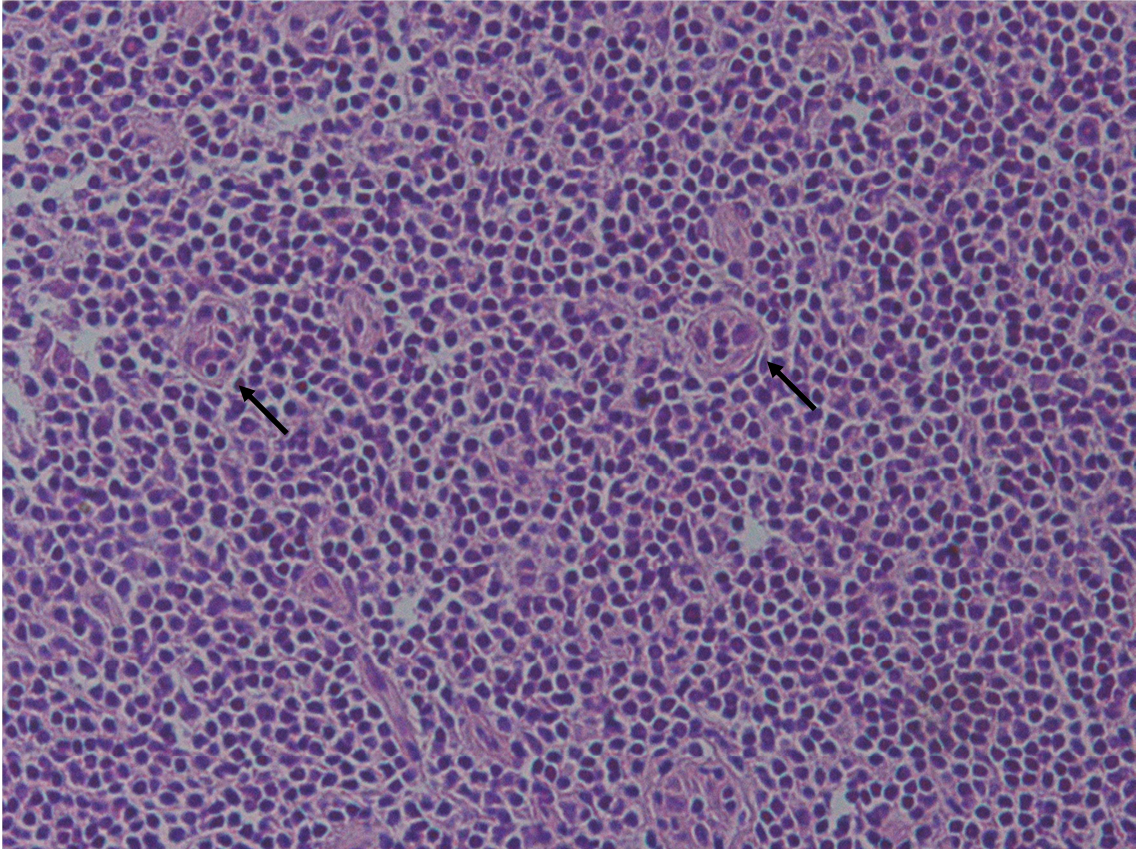
Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego, wybarwiony metodą H+E. W trakcie oceny histopatologicznej stwierdzono rozrost grudkowy w pobranym materiale. Uwagę zwracają komórki nowotworowe obecne w naczyniach świadczące o rozsiewie nowotworu (↑).

Pow. około 200x

Fot. 26. Grupa II, przypadek 30.

Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego, poddany reakcji IHC. Wynik pozytywny, ukazujący obecność mikroprzerzutów w badanym materiale (1). W świetle naczyń widoczne pojedyncze komórki nowotworowe wybarwione na brązowo (2).

Pow. około 100x



Fot. 27. Grupa III, przypadek 16.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

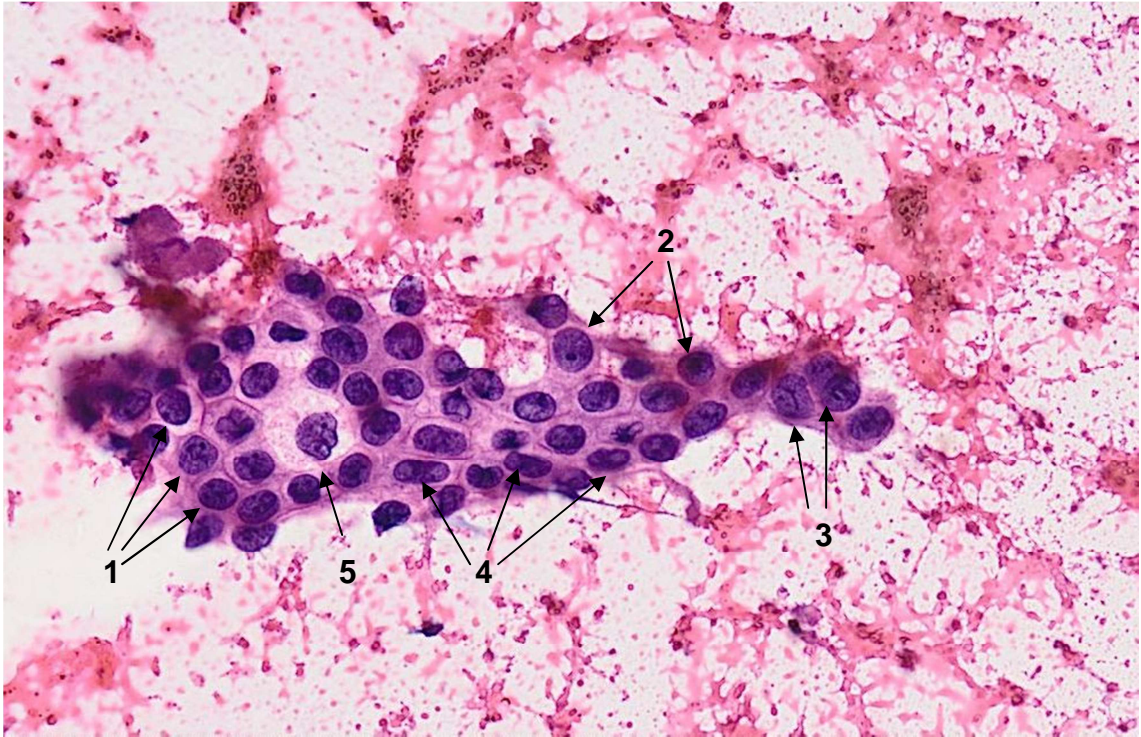
Fotografia przedstawia atypowy płat komórek gruczołowych trzustki z powiększonymi, polimorficznymi, hiperchromatycznymi jądrami, wokół których występuje halo (1). W jądrach wyraźnie zaznaczone jąderka (2), występują także bruzdy (3) oraz wodniczki (4). W lewej części płata komórek gruczołowych uwidoczniona komórka z nieregularnym jądrem otoczonym wodniczkami (5).

Pow. około 400x

Fot. 28. Grupa III, przypadek 16.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek nowotworowych trzustki.

Pow. około 400x



Fot. 29. Grupa III, przypadek 12.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

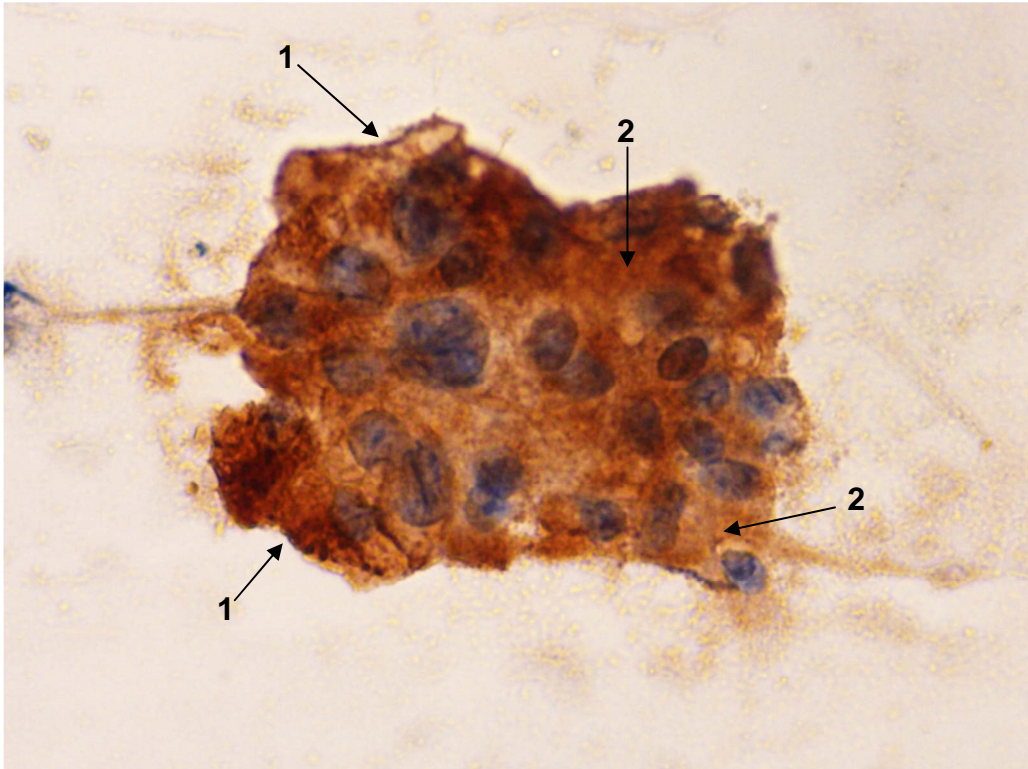
Widoczny płat komórek gruczołowych trzustki bez cech atypii, uwagę zwracają układy mikropęcherzykowe (1). Jądra komórek gruczołowych zawierają wyraźne jąderka (2).

Pow. około 200x

Fot. 30. Grupa III, przypadek 12.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny w postaci silnie wybarwionych na brązowo błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek nowotworowych trzustki.

Pow. około 1000x



Fot. 31. Grupa III, przypadek 20.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

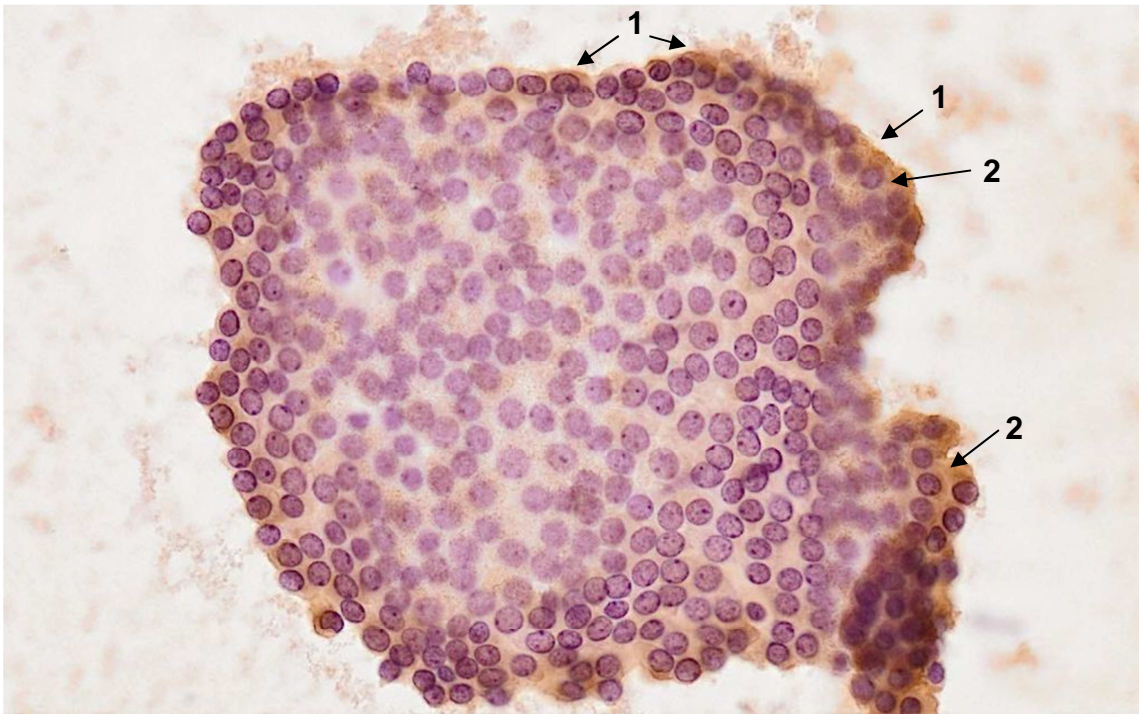
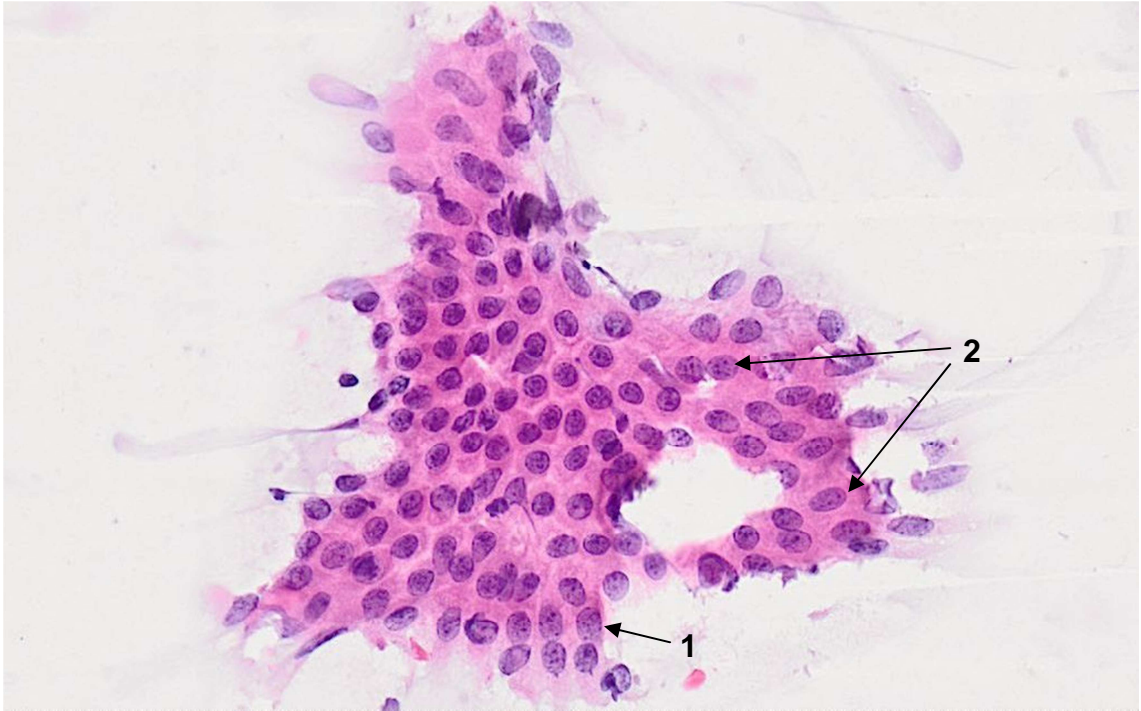
Płat komórek gruczołowych trzustki z nieznaczną atypią. Jądra komórkowe powiększone (1), owalne, okrągłe lub nieregularne z wyraźnie zaznaczoną chromatyną oraz jąderkami (2).

Pow. około 200x

Fot. 32. Grupa III, przypadek 20.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek raka gruczołowego trzustki.

Pow. około 200x



Fot. 33. Grupa III, przypadek 20.

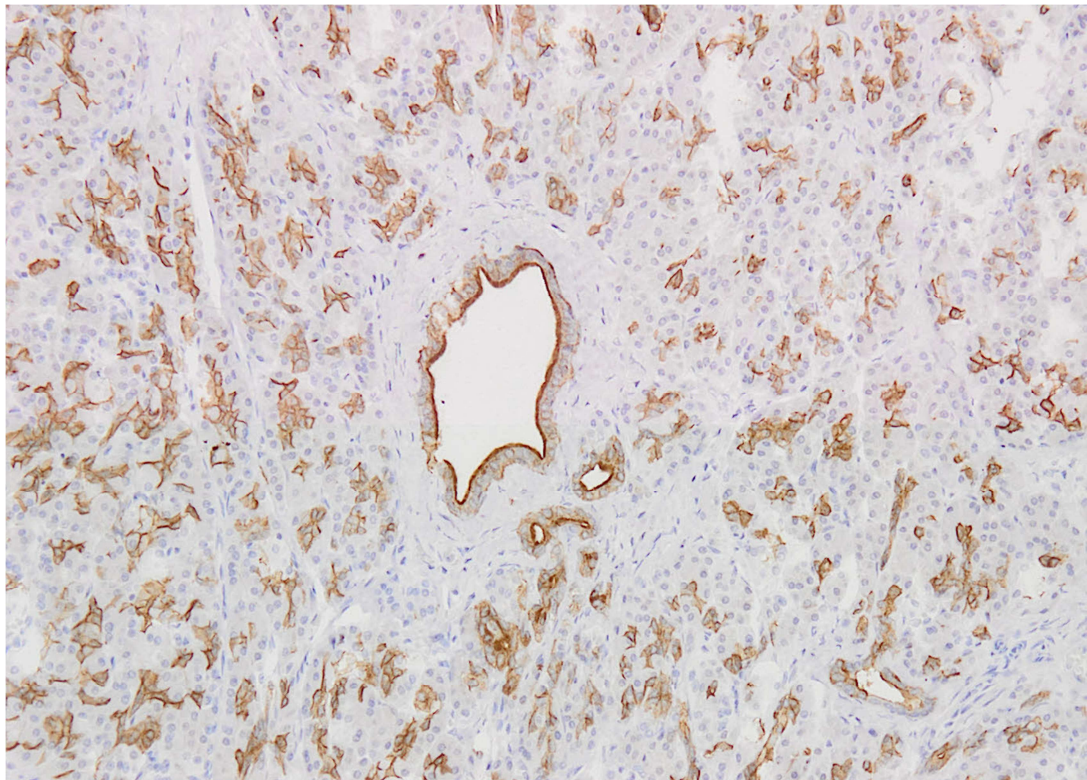
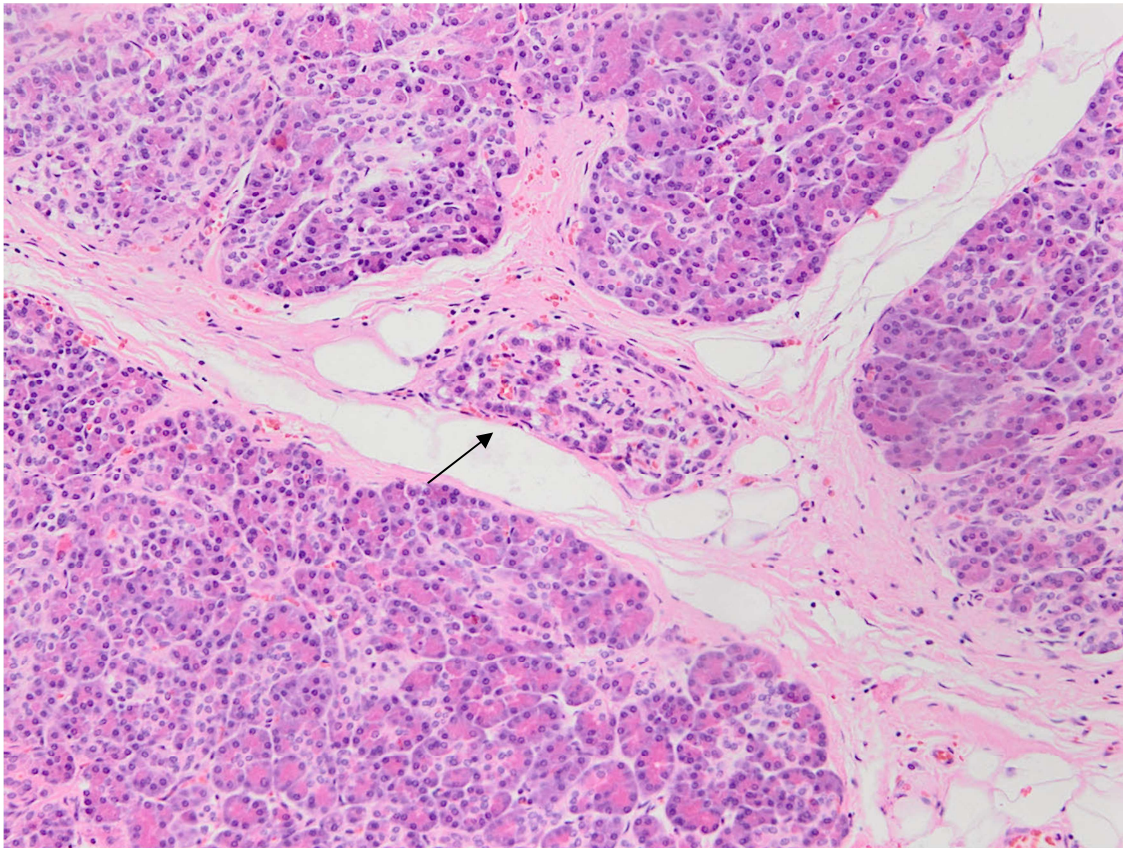
Preparat histopatologiczny wybarwiony metodą H+E, sporządzony z materiału pobranego z trzustki. Rozpoznanie histopatologiczne: *Adenocarcinoma ductale pancreatis*. Na fotografii widoczne ognisko nowotworowe (↑).

Pow. około 100x

Fot. 34. Grupa III, przypadek 20.

Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z trzustki. Wynik przeprowadzonej reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9 pozytywny. Fotografia uwidacznia nacieki nowotworowe wzdłuż przewodu trzustkowego.

Pow. około 100x



Fot. 35. Grupa III, przypadek 17.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

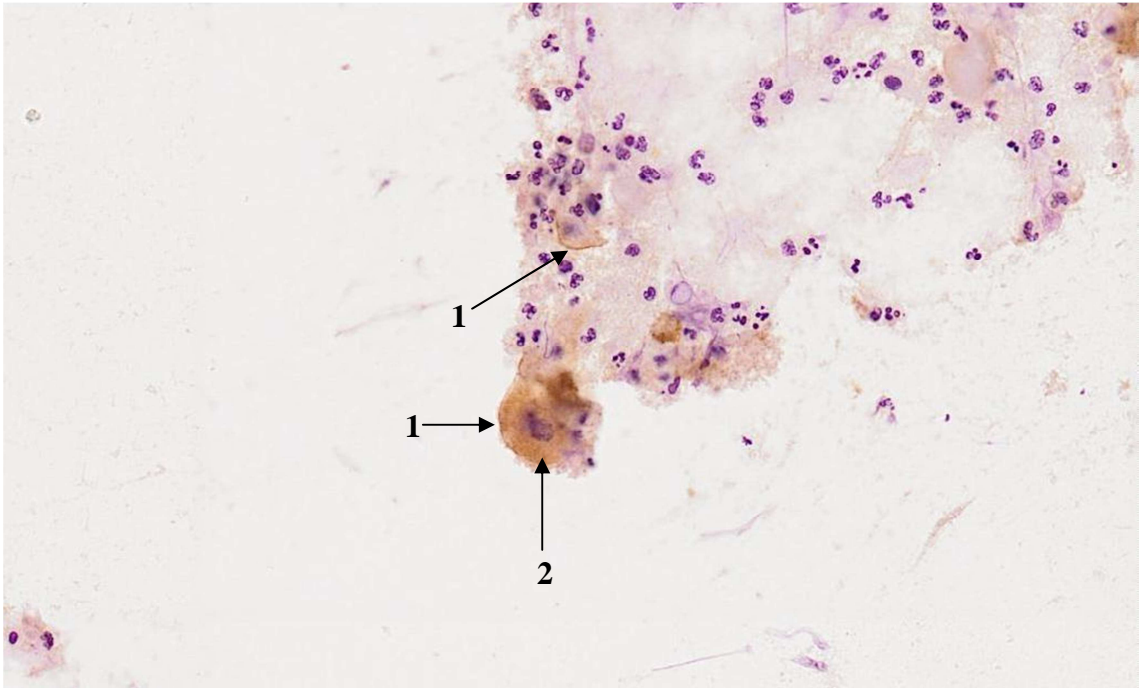
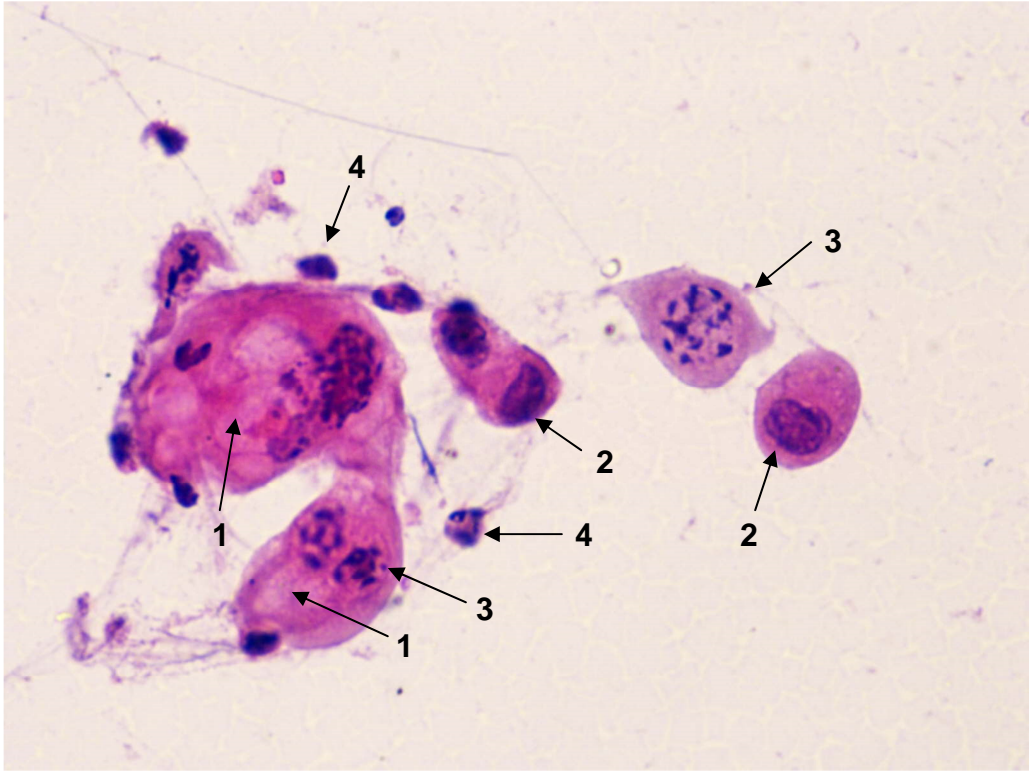
Fotografia przedstawia komórki gruczołowe trzustki z wyraźną atypią. W cytoplazmie komórek występują wodniczki (1), jądra komórkowe są nieregularne i powiększone (2), wykazują wzmożoną aktywność mitotyczną (3). Widoczne są komórki nacieku zapalnego (4).

Pow. około 1000x

Fot. 36. Grupa III, przypadek 17.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek nowotworowych.

Pow. około 200x



Fot. 37. Grupa III, przypadek 17.

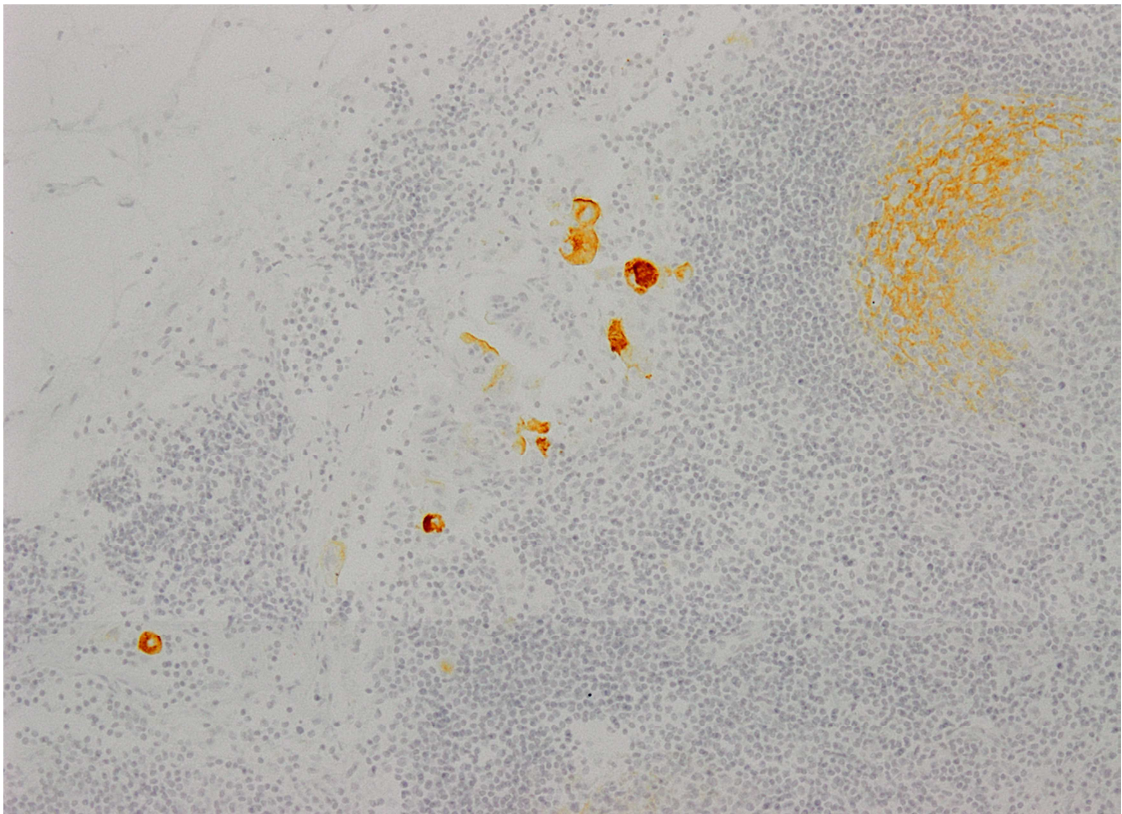
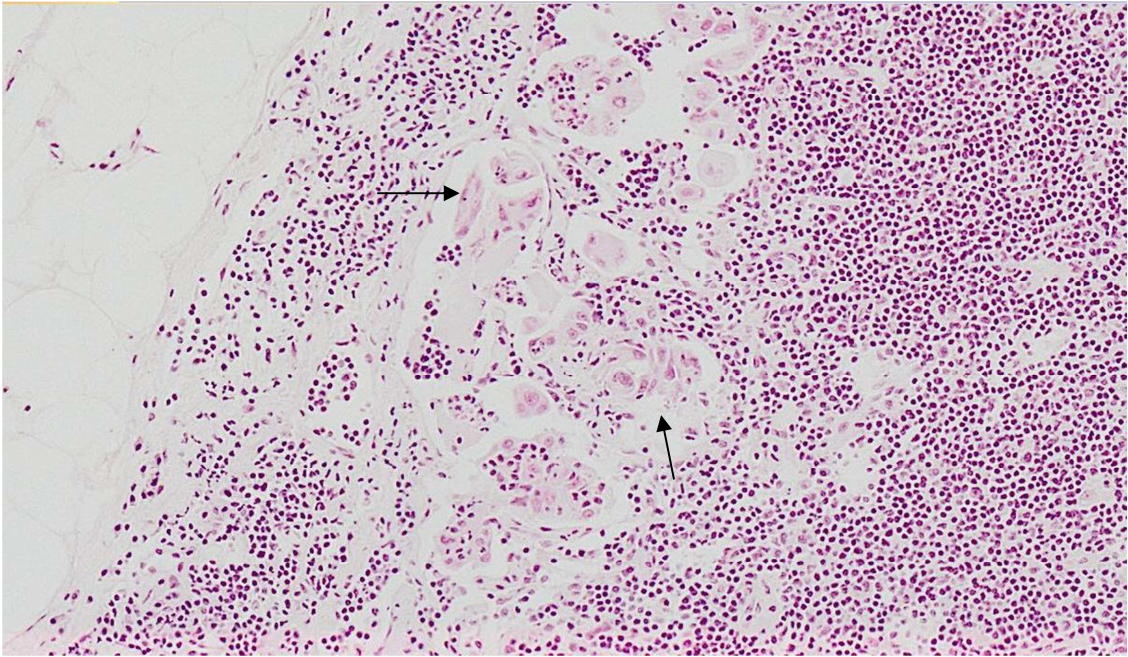
Preparat histopatologiczny wykonany z materiału pobranego z okołotrzustkowego węzła chłonnego, wybarwiony metodą H+E. Fotografia przedstawia fragment węzła chłonnego z widocznymi mikroprzerzutami raka gruczołowego trzustki (↑).

Pow. około 100x

Fot. 38. Grupa III, przypadek 17.

Preparat histopatologiczny wykonany z materiału pobranego z okołotrzustkowego węzła chłonnego, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wyniki reakcji pozytywne.

Pow. około 100x



Fot. 39. Grupa III, przypadek 11.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

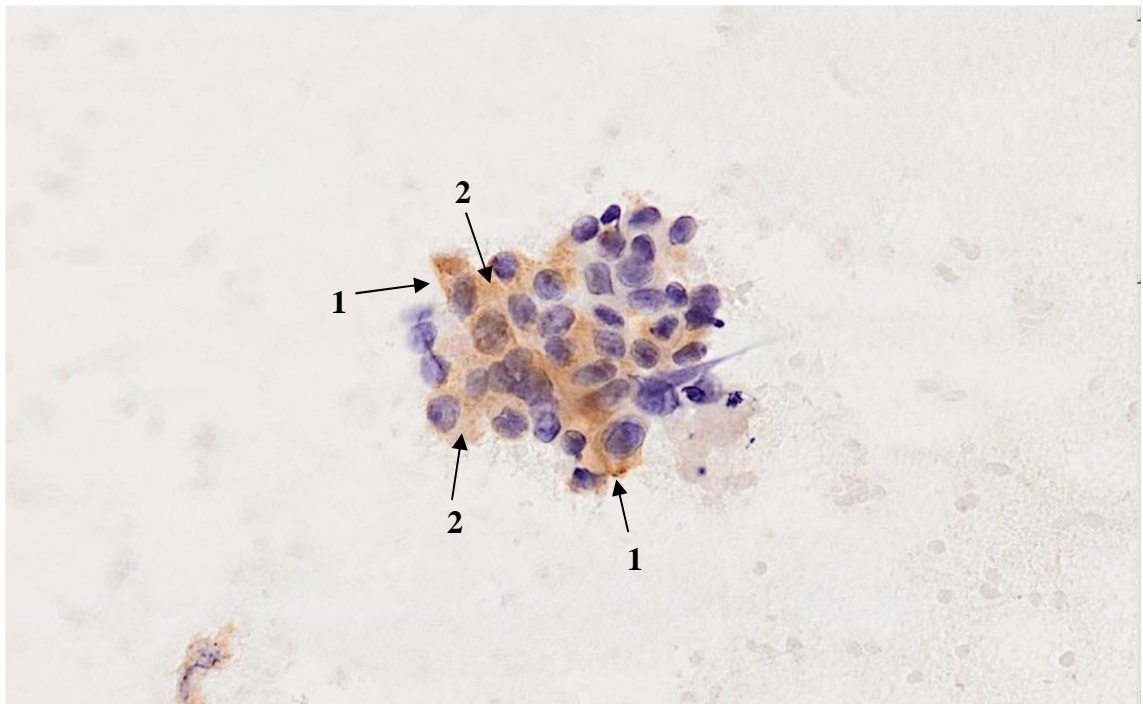
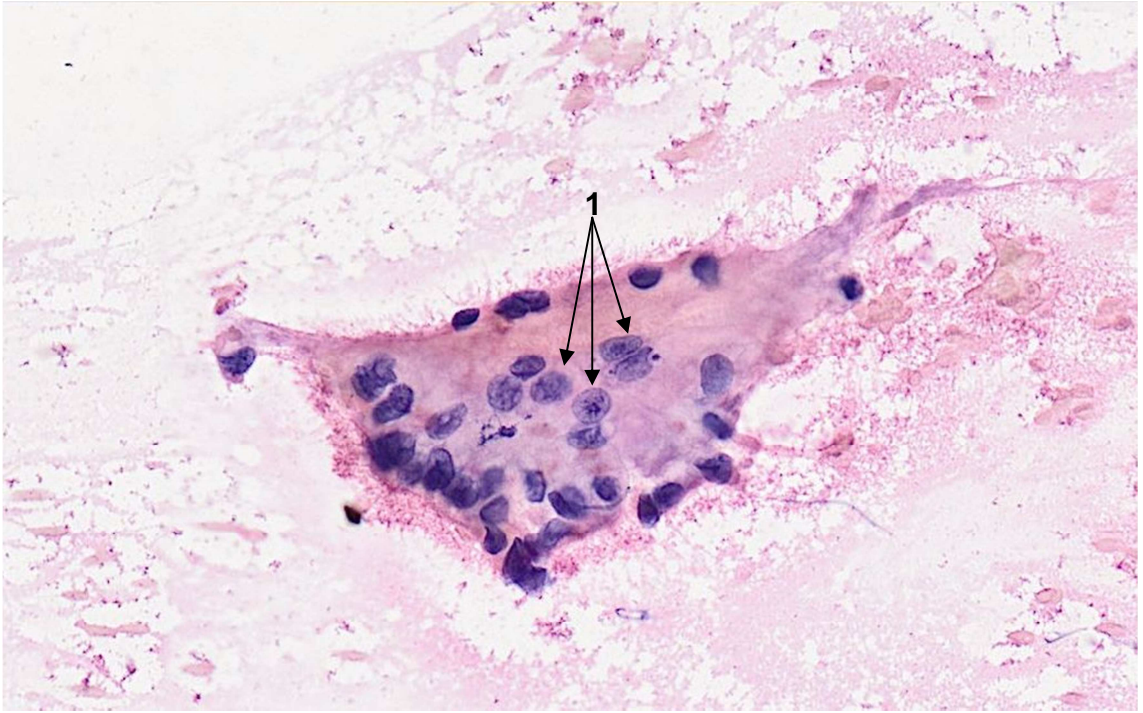
Płat komórek gruczołowych trzustki z cechami atypii. Jądra komórkowe nieregularne, powiększone, hiperchromatyczne (1).

Pow. około 400x

Fot. 40. Grupa III, przypadek 11.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek raka gruczołowego trzustki.

Pow. około 400x



Fot. 41. Grupa III, przypadek 11.

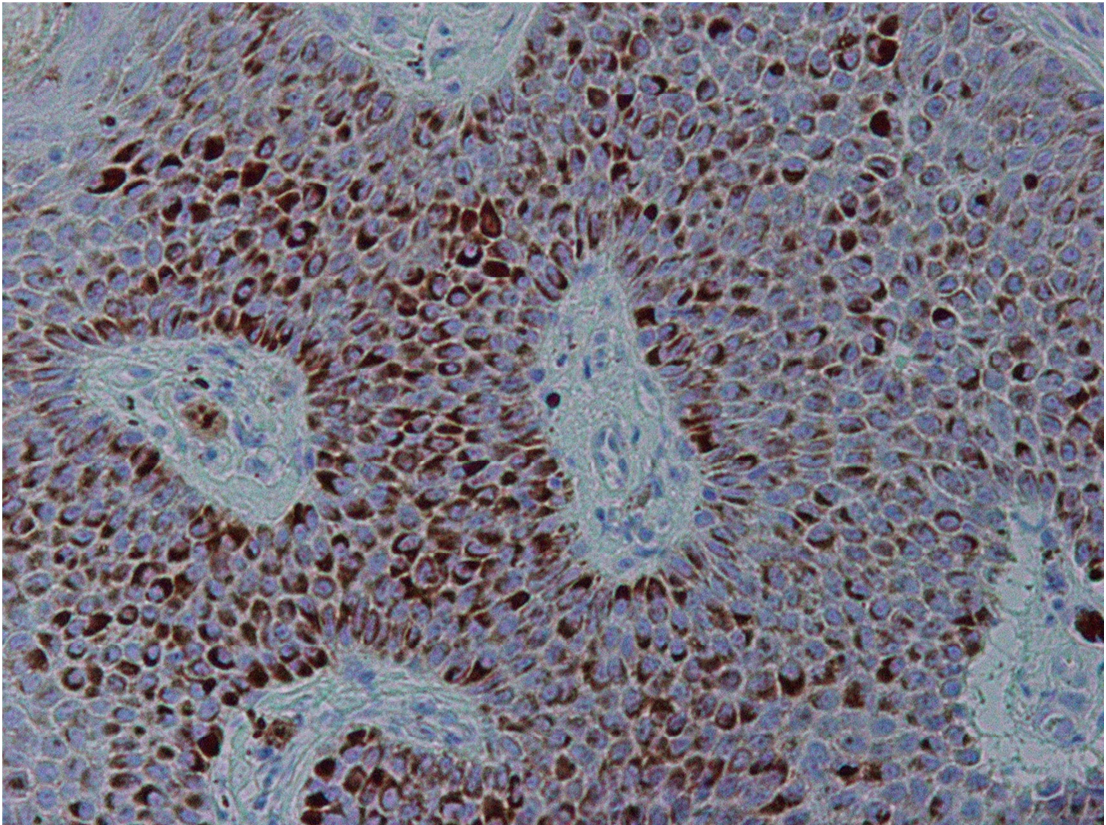
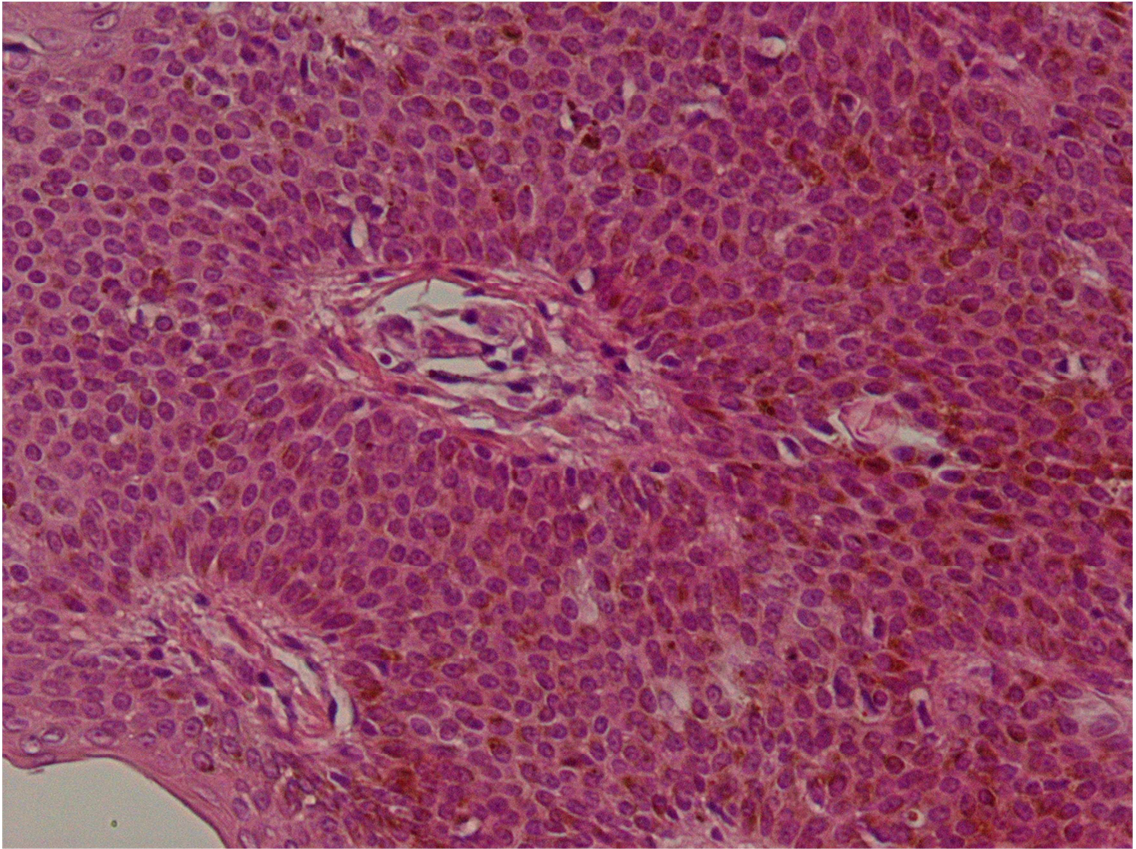
Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z tkanki tłuszczowej z drobnymi ogniskami utkania trzustki, wybarwiony metodą H+E.

Pow. około 400x

Fot. 42. Grupa III, przypadek 11.

Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z tkanki tłuszczowej z drobnymi ogniskami utkania trzustki, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon oraz cytoplazmy komórek nowotworowych.

Pow. około 400x



Fot. 43. Grupa III, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Widoczne 2 grupy atypowych komórek gruczołowych trzustki. Jądra komórek nieregularne (1), powiększone (2), z widocznymi jąderkami (3) oraz bruzdami (4). W cytoplazmie jednej z komórek widoczna wodniczka (5).

Pow. około 400x

Fot. 44. Grupa III, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon (1) oraz cytoplazmy (2) komórek raka gruczołowego trzustki.

Pow. około 200x



Fot. 45. Grupa III, przypadek 22.

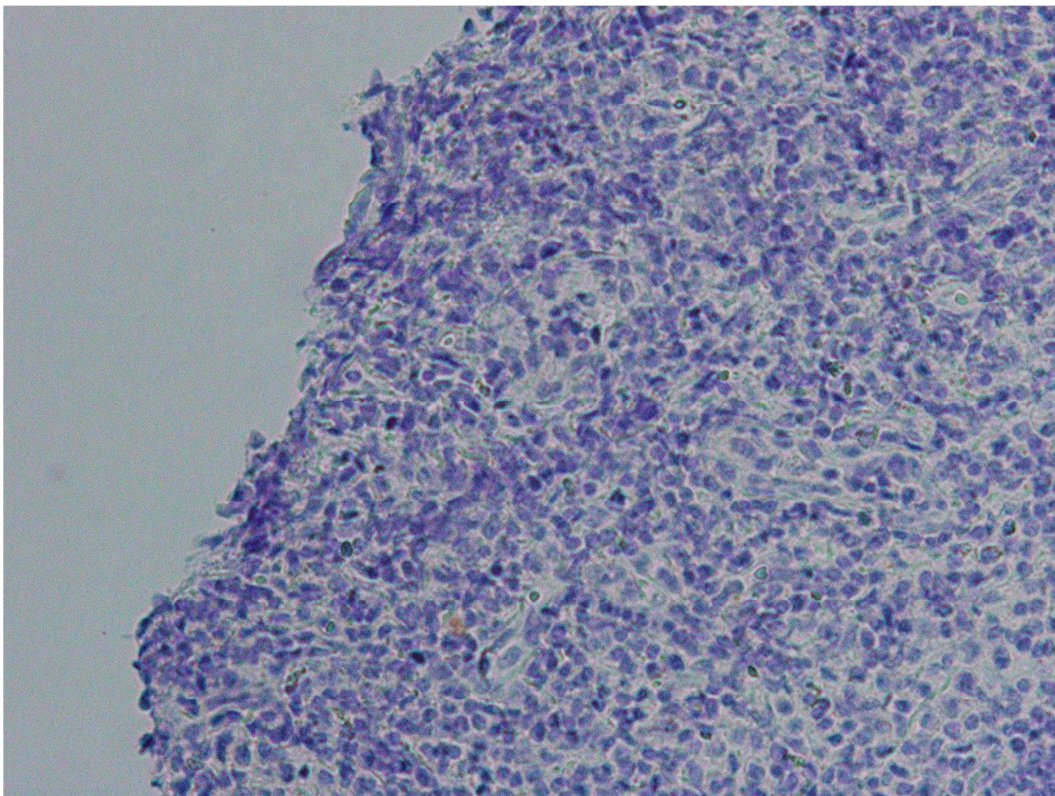
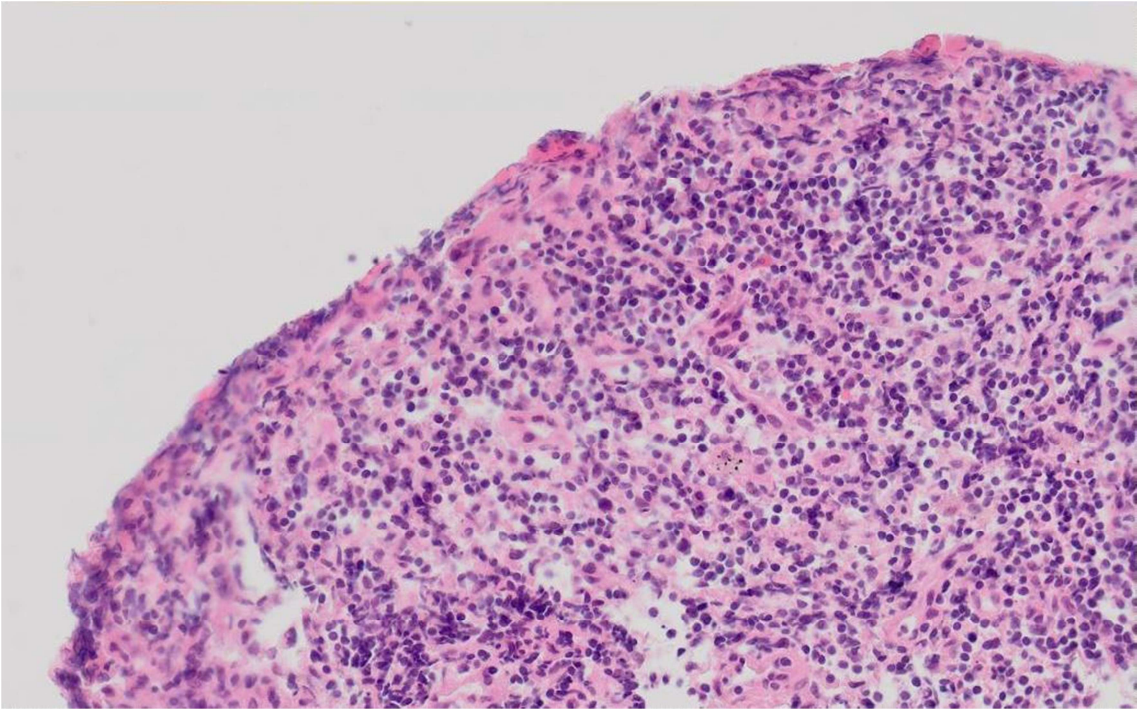
Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego, wybarwiony metodą H+E. Fotografia przedstawia reaktywny węzeł chłonny bez zmian nowotworowych.

Pow. około 100x

Fot. 46. Grupa III, przypadek 22.

Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji negatywny.

Pow. około 100x



Fot. 47. Grupa III, przypadek 9.

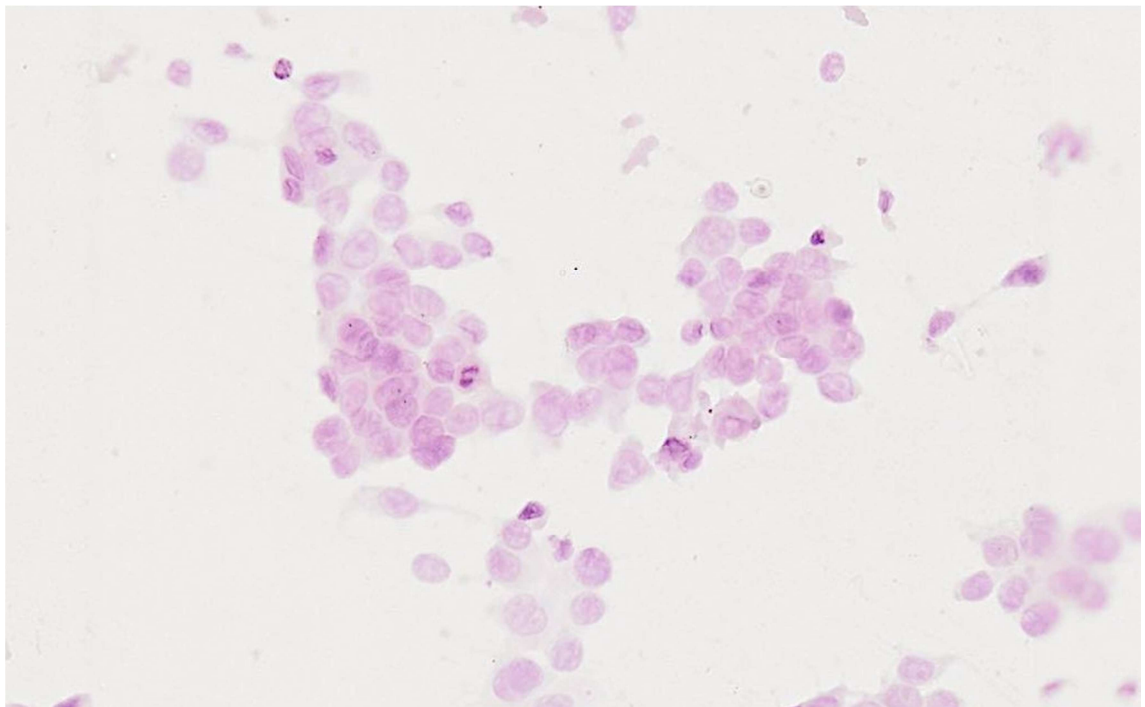
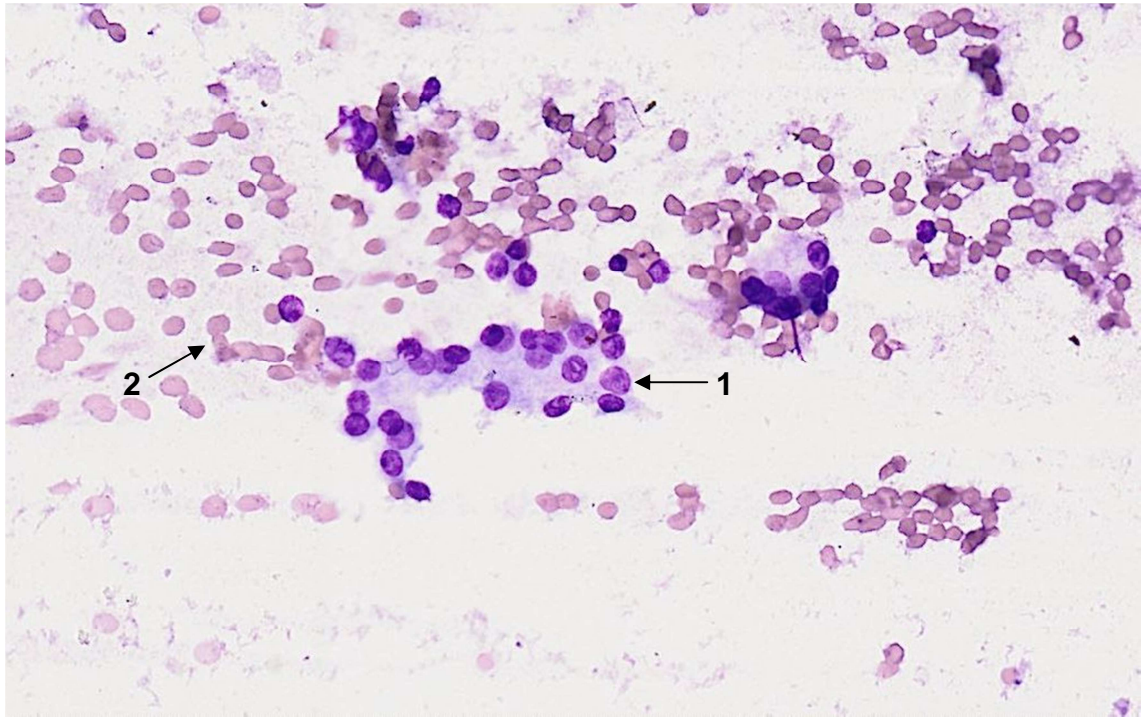
Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą MGG. Komórki gruczołowe trzustki bez cech atypii. Pojedyncze jądra komórkowe nieznacznie powiększone (1). W tle widoczne liczne erytrocyty (2).

Pow. około 400x

Fot. 48. Grupa III, przypadek 9.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Brak wybarwienia błon komórkowych oraz cytoplazmy na brązowo wskazuje na wynik negatywny.

Pow. około 400x



Fot. 49. Grupa III, przypadek 9.

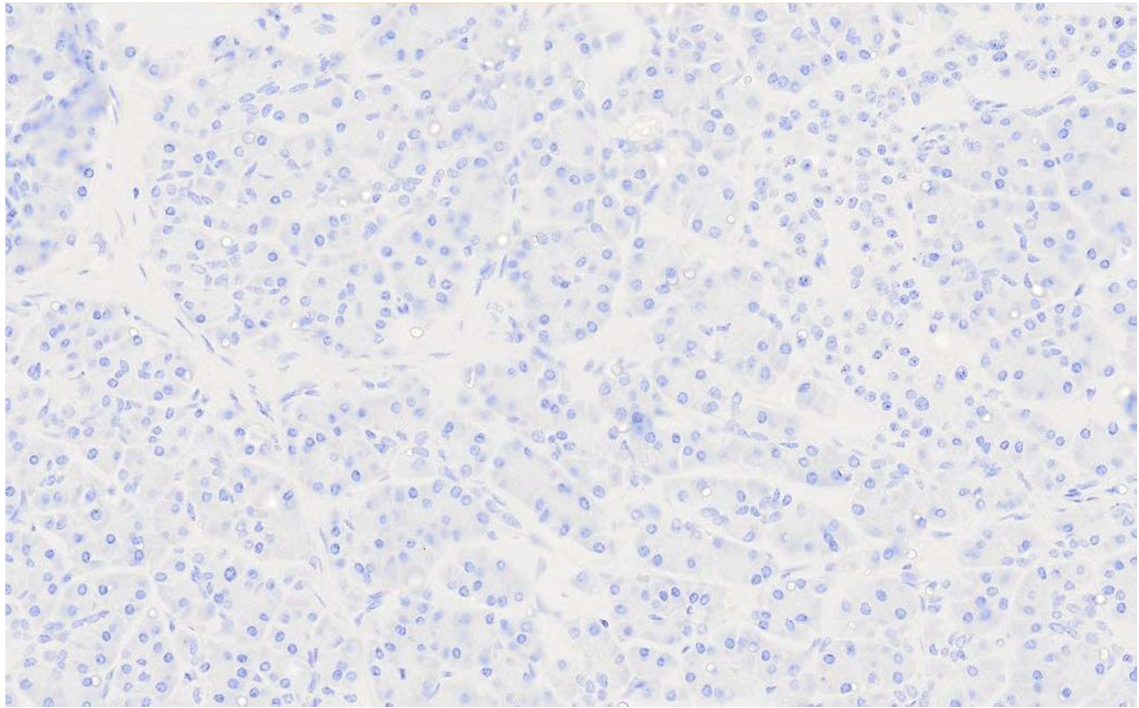
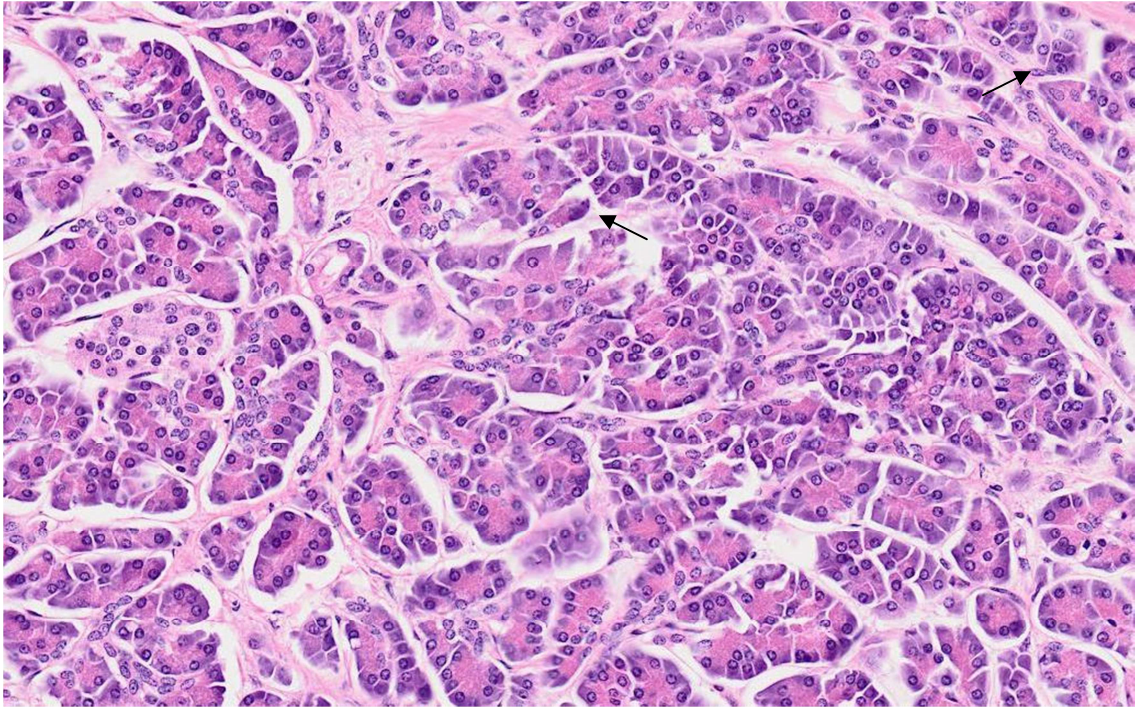
Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z guza trzustki, wybarwiony metodą H+E. W utkaniu trzustki obecne nieliczne atypowe komórki odpowiadające rakowi gruczołowemu (↑).

pow. około 400x

Fot. 50. Grupa III, przypadek 9.

Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z guza trzustki, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Otrzymany negatywny wynik w ogólnej masie guza potwierdza ujemny rezultat oznaczenia ICC przeprowadzonego w materiale cytologicznym. Uzyskany rezultat należy określić mianem fałszywie ujemnego.

Pow. około 400x



Fot. 51. Grupa IV, przypadek 42.

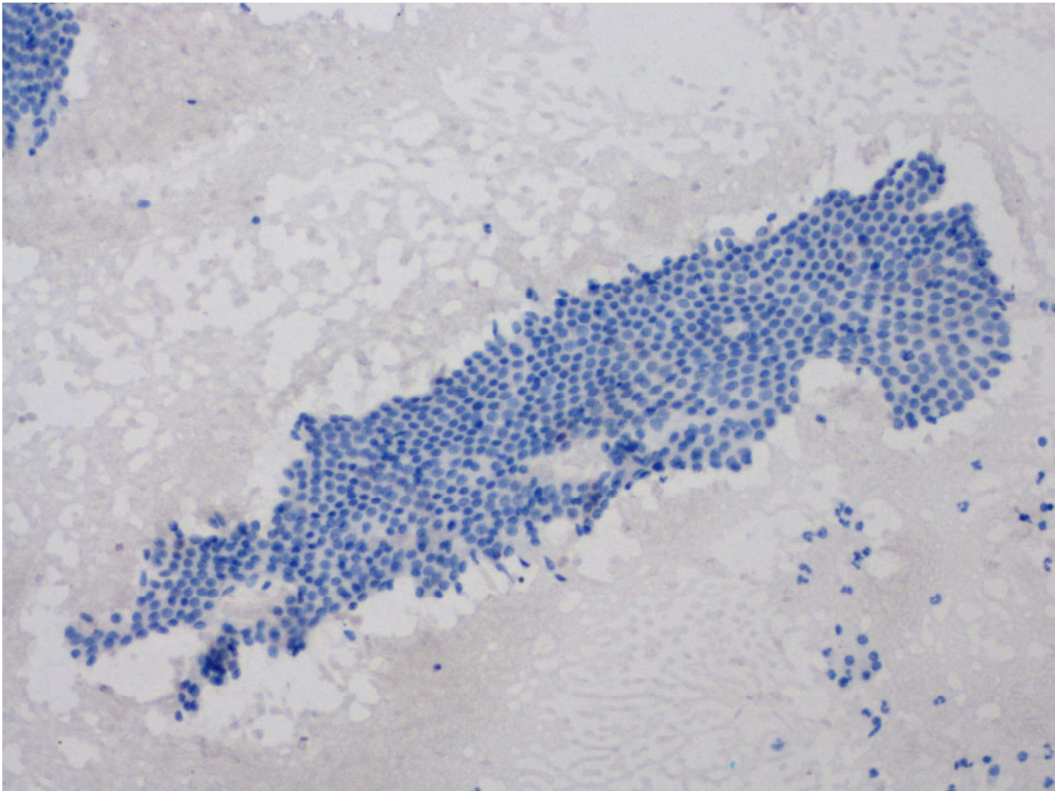
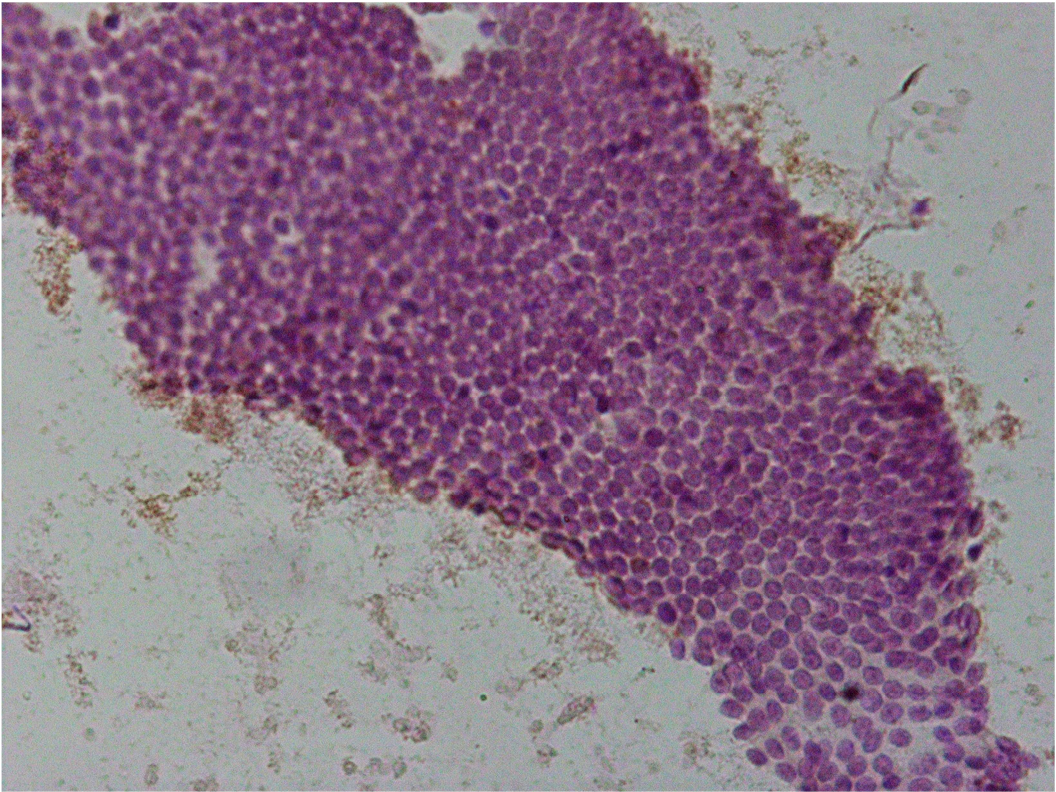
Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E. Widoczny płat normotypowych komórek gruczołowych trzustki.

Pow. około 200x

Fot. 52. Grupa IV, przypadek 42.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji negatywny – brak brązowego zabarwienia błon oraz cytoplazmy komórek gruczołowych trzustki.

Pow. około 100x



Fot. 53. Grupa IV, przypadek 34.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

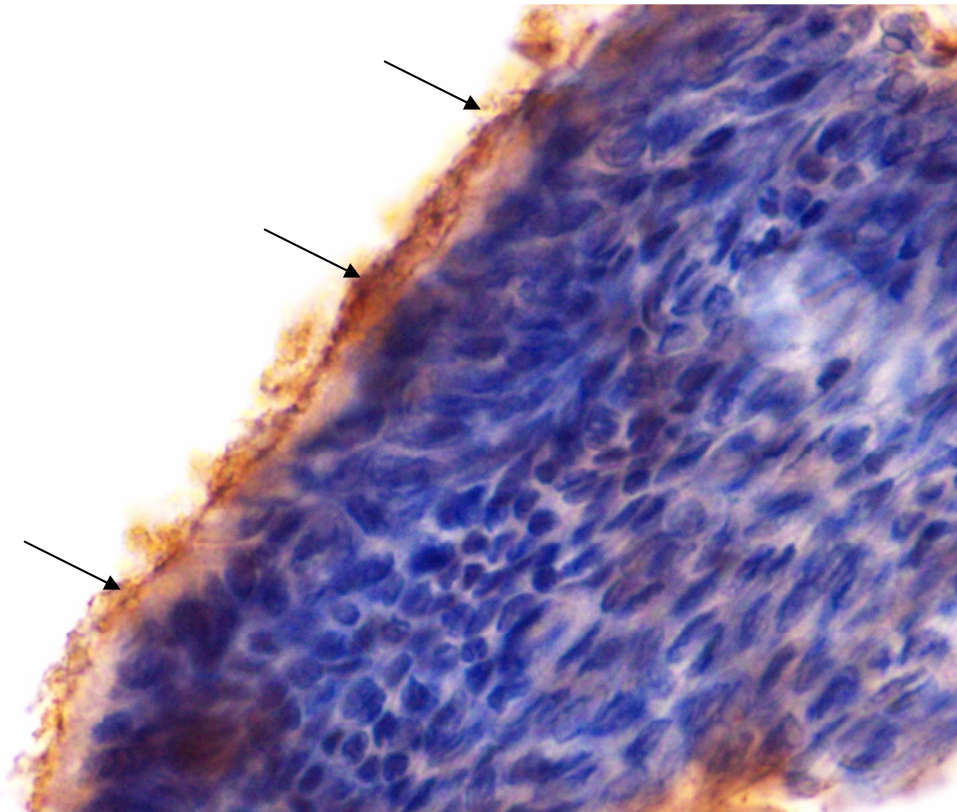
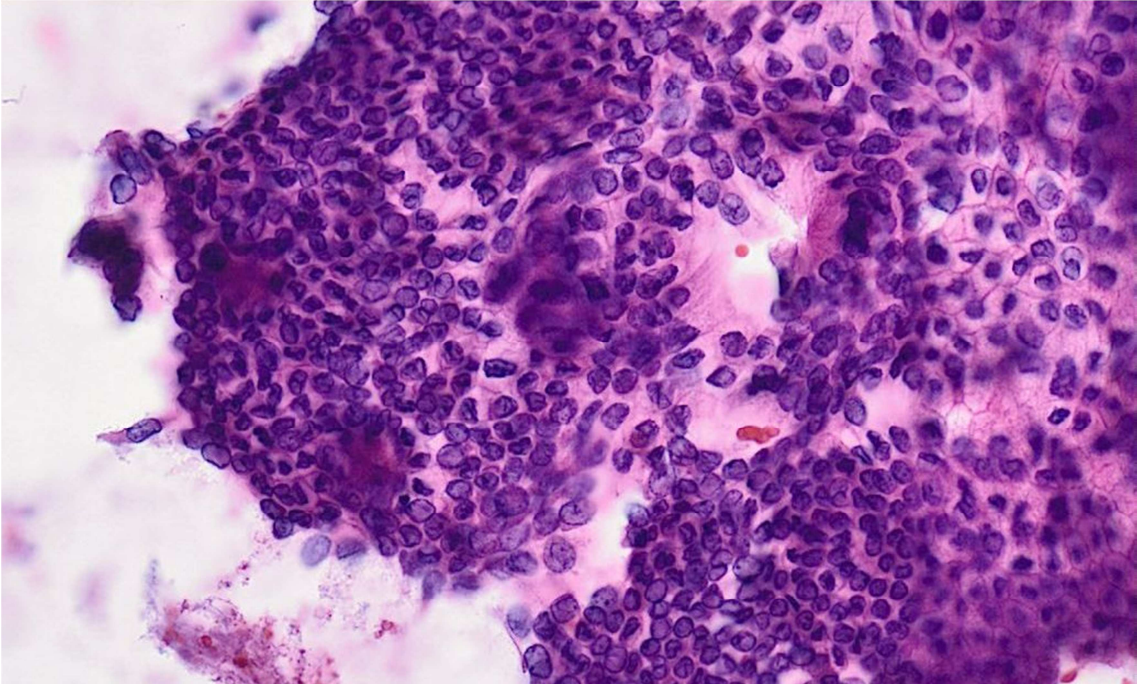
Fotografia przedstawia płat komórek gruczołowych trzustki. Jądra komórkowe nieregularne z widocznymi jąderkami oraz bruzdami.

Pow. około 200x

Fot. 54. Grupa IV, przypadek 34.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci wyraźnego brązowego wybarwienia błon komórek nowotworowych trzustki (↑).

Pow. około 400x



Fot. 55. Grupa IV, przypadek 18.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

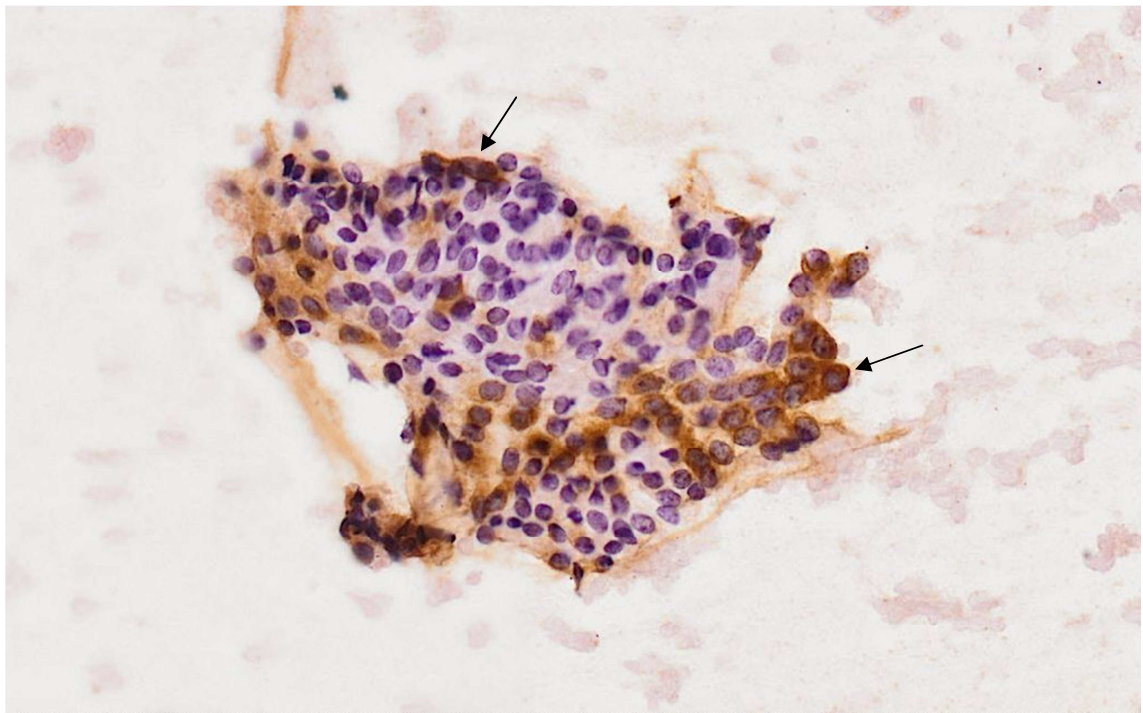
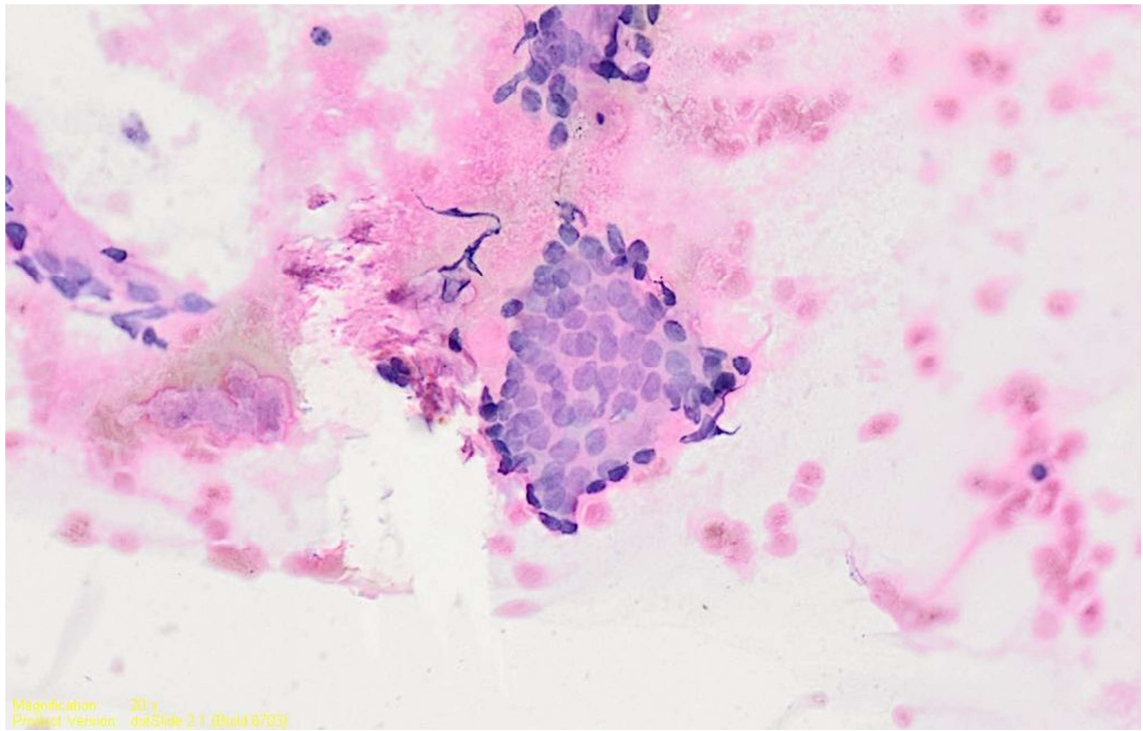
Widoczne trzy grupy komórek gruczołowych trzustki bez cech atypii.

Pow. około 200x

Fot. 56. Grupa IV, przypadek 18.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji pozytywny, widoczny w postaci brązowego wybarwienia błon oraz cytoplazmy komórek gruczołowych trzustki (↑).

Pow. około 200x



Fot. 57. Grupa IV, przypadek 18.

Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z trzustki, wybarwiony metodą H+E. Uwagę zwracają cewy nowotworowe. Wynik rozpoznania histopatologicznego:

Adenocarcinoma G1.

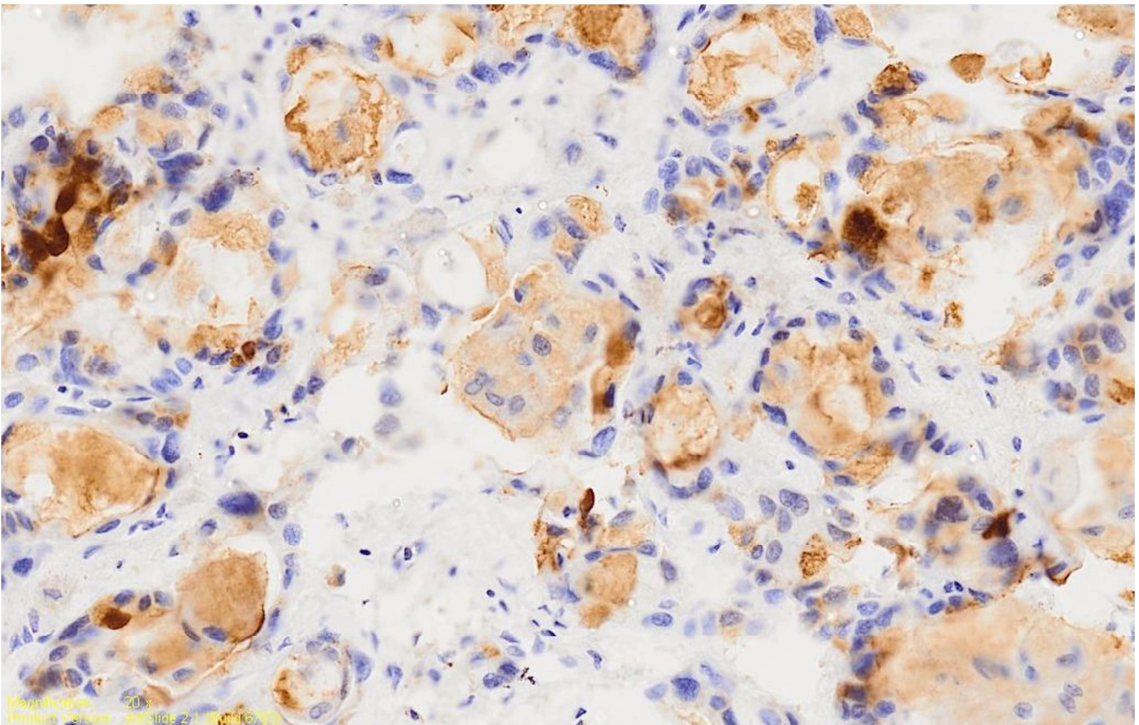
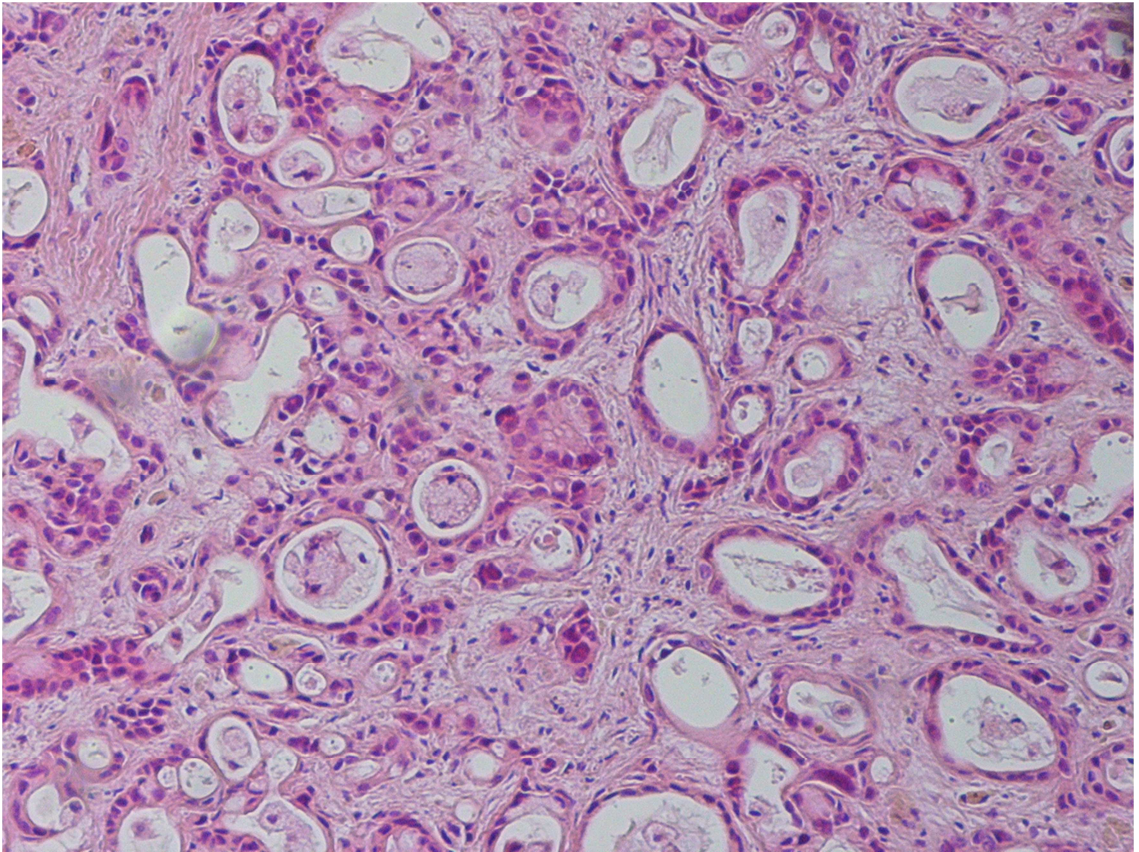
Pow. około 200x

Fot. 58. Grupa IV, przypadek 18.

Preparat histopatologiczny sporządzony z materiału pobranego z trzustki, poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9.

Wynik reakcji pozytywny.

Pow. około 200x



Fot. 59. Grupa IV, przypadek 23.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

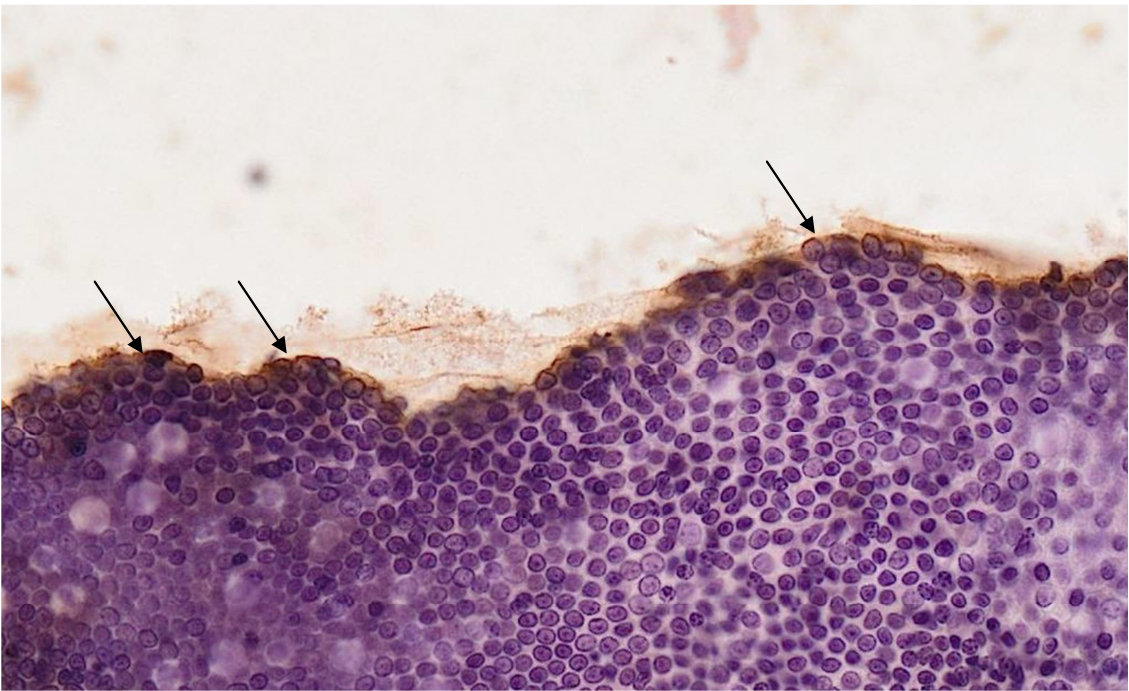
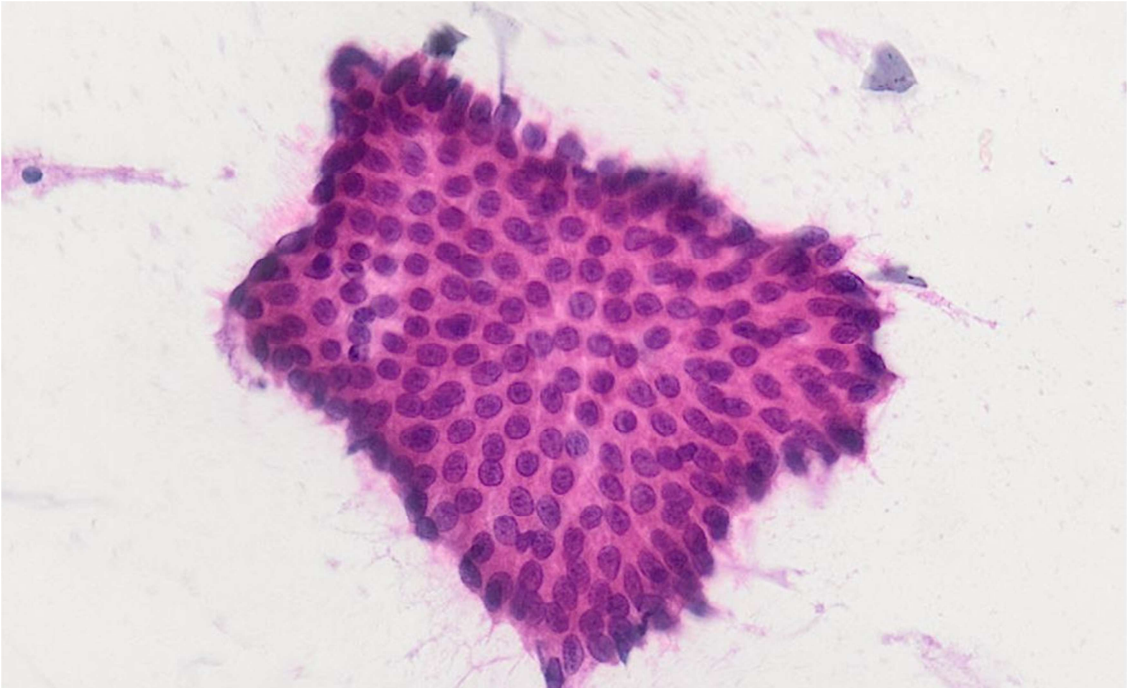
Widoczny płat normotypowych komórek gruczołowych trzustki.

Pow. około 400x

Fot. 60. Grupa IV, przypadek 23.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji immunocytochemicznej z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji wyraźnie pozytywny w postaci brązowego wybarwienia błon komórek gruczołowych trzustki (↑).

Pow. około 200x



Fot. 61. Grupa IV, przypadek 23.

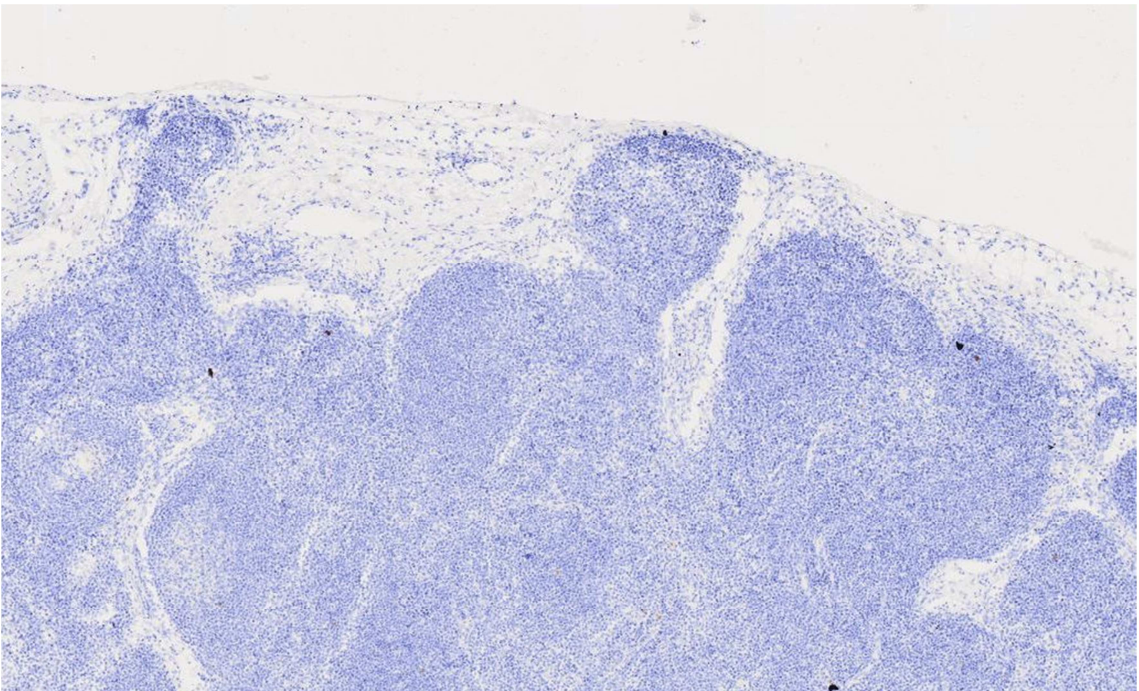
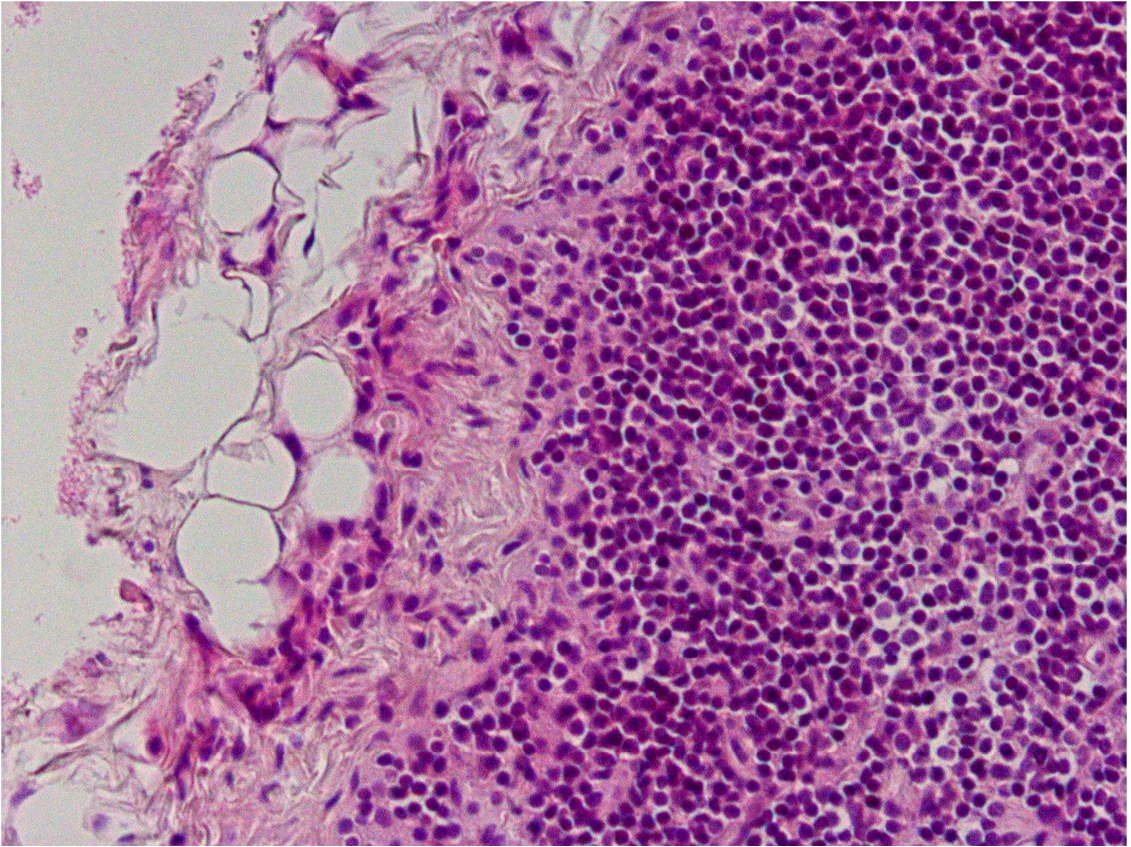
Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego oraz przylegającej tkanki tłuszczowej. Materiał wybarwiony metodą H+E. W rozpoznaniu histopatologicznym stwierdzono odczynowy węzeł chłonny bez nacieku nowotworowego.

Pow. około 200x

Fot. 62. Grupa IV, przypadek 23.

Preparat histopatologiczny sporządzony ze skrawków okołotrzustkowego węzła chłonnego oraz przylegającej tkanki tłuszczowej. Materiał poddany reakcji IHC z oznaczeniem antygenu CA 19-9. Wynik reakcji negatywny.

Pow. około 100x



Fot. 63. Grupa IV, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, wybarwiony metodą H+E.

Brak wyraźnej atypii komórkowej.

Pow. około 400x

Fot. 64. Grupa IV, przypadek 22.

Preparat cytologiczny wykonany z materiału pobranego z trzustki za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, poddany reakcji ICC. Wynik reakcji wyraźnie pozytywny w postaci brązowego wybarwienia błon oraz cytoplazmy komórek gruczołowych trzustki.

Pow. około 1000x

