

**Anna Jabłońska**

**Ocena przydatności cytologii soku trzustkowego  
i wymazów szczoteczkowych w diagnostyce  
zwężeń przewodu trzustkowego głównego**

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Klinice Gastroenterologii  
i Hepatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marian Smoczyński

Gdańsk 2012

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	4
1. WSTĘP.....	6
1.1. Wprowadzenie.....	6
1.2. Zwężenia przewodu trzustkowego.....	7
1.3. Zwężenia dróg żółciowych.....	7
1.4. Rak trzustki.....	9
1.5. Badania obrazowe w diagnostyce raka trzustki.....	11
1.6. Rak dróg żółciowych.....	15
1.7. Badania obrazowe w diagnostyce raka dróg żółciowych.....	16
1.8. Markery surowicze.....	17
1.9. Cytologia i wymazy szczoteczkowe.....	18
1.10. Markery molekularne.....	19
1.11. Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> .....	21
2. CELE PRACY.....	23
3. MATERIAŁ I METODY.....	24
3.1. Materiał.....	24
3.2. Metody.....	28
3.2.1. Cytologia.....	31
3.2.2. Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> .....	35
3.2.3. Analiza statystyczna.....	37

4. WYNIKI.....	39
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	43
6. DYSKUSJA.....	45
7. WNIOSKI.....	59
8. PIŚMIENICTWO.....	61
9. STRESZCZENIE.....	71
10. ABSTRACT.....	74
11. ZAŁĄCZNIK.....	77

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>C</b>	cytologia
<b>CA 19-9</b>	antygen rakowy 19-9 ( <i>cancer antigen 19-9</i> lub <i>carbohydrate antigen 19-9</i> )
<b>CCA</b>	rak dróg żółciowych ( <i>cholangiocarcinoma</i> )
<b>CEA</b>	antygen rakowo-płodowy ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>CE-EUS</b>	endoskopowa ultrasonografia ze wzmocnieniem kontrastowym ( <i>contrast-enhanced endoscopic ultrasound</i> )
<b>CEP</b>	sonda centromerowa ( <i>Chromosome Enumeration Probe</i> )
<b>CI</b>	przedział ufności ( <i>confidence interval</i> )
<b>DAPI</b>	4,6-diamidyno-2-fenylindol
<b>DŻ</b>	drogi żółciowe
<b>ECPW</b>	endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna
<b>EUS</b>	endoskopowa ultrasonografia
<b>EUS-FNA</b>	biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pod kontrolą EUS ( <i>EUS-guided fine needle aspiration</i> )
<b>FISH</b>	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
<b>IBD</b>	nieswoiste zapalenia jelita ( <i>inflammatory bowel disease</i> )
<b>IPMN</b>	wewnątrzprzewodowy brodawkowaty nowotwór śluzotwórczy ( <i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i> )
<b>K</b>	kobiety

<b>LSI</b>	sonda unikalna dla locus ( <i>Locus Specific Identifier</i> )
<b>M</b>	mężczyźni
<b>MCN</b>	śluzowy nowotwór torbielowaty ( <i>mucinous cystic neoplasm</i> )
<b>MRCP</b>	cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego ( <i>magnetic resonance cholangiopancreatography</i> )
<b>MRI</b>	rezonans magnetyczny ( <i>magnetic resonance imaging</i> )
<b>n</b>	liczba pacjentów
<b>NS</b>	różnica nieistotna statystycznie ( <i>not significant</i> )
<b>PanIN</b>	śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa ( <i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i> )
<b>PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy ( <i>polimerase chain reaction</i> )
<b>PET</b>	pozytonowa tomografia emisyjna ( <i>positron emission tomography</i> )
<b>PSC</b>	pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych ( <i>primary sclerosing cholangitis</i> )
<b>PT</b>	przewód trzustkowy główny
<b>TK</b>	wielorzędowa tomografia komputerowa ze wzmocnieniem kontrastowym
<b>USG</b>	ultrasonografia przezbrzuszną
<b>WPWD</b>	wartość predykcyjna wyniku dodatniego
<b>WPWU</b>	wartość predykcyjna wyniku ujemnego

## 1. WSTĘP

### 1.1 Wprowadzenie

Wczesne wykrywanie nowotworów złośliwych trzustki i dróg żółciowych pozostaje wyzwaniem dla klinicystów i patomorfologów. Zarówno w przypadku raka trzustki, jak i raka dróg żółciowych pierwszą zmianą patologiczną obserwowaną w badaniach obrazowych mogą być zwężenia przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych bez ewidentnego guza. Zwężenia te stanowią istotny problem diagnostyczny, ponieważ ich przyczyną mogą być także choroby nienowotworowe. Dokładne rozpoznanie jest kluczowe dla wyboru odpowiedniej strategii terapeutycznej. Wczesna interwencja chirurgiczna w przypadku złośliwych zwężeń daje chorym szansę na wyleczenie dzięki doszczętnemu usunięciu zmiany. Leczenie operacyjne raka trzustki lub dróg żółciowych wiąże się jednak z poważnym zabiegiem obciążonym potencjalnie ciężkimi powikłaniami. Należy więc unikać zbyt pospiesznych interwencji chirurgicznych w wątpliwych przypadkach, jeśli można postawić ostateczne rozpoznanie innymi metodami. Przydatność badań obrazowych w rozpoznawaniu złośliwej etiologii zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych jest ograniczona z powodu szerzenia się nowotworu wzdłuż ściany przewodu we wczesnym okresie choroby.[1] Z kolei rola nowotworowych markerów surowiczych we wczesnej diagnostyce raka trzustki i dróg żółciowych jest niewielka ze względu na ich niską czułość i swoistość.[1-3] Dlatego też próby uzyskania rozpoznania cytologicznego są ważnym elementem różnicowej diagnostyki zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych. Cytologiczne potwierdzenie złośliwego procesu leżącego u podłoża zwężenia, jest potrzebne zarówno w celu podjęcia decyzji o radykalnym zabiegu chirurgicznym, jak i leczeniu paliatywnym.

## 1.2 Zwężenia przewodu trzustkowego

Zwężenia przewodu trzustkowego głównego (PT) są najczęściej spowodowane przewlekłym zapaleniem trzustki. Drugą istotną przyczyną zwężeń PT jest rak trzustki. Innymi rzadszymi przyczynami zwężeń PT mogą być zarówno procesy nowotworowe, takie jak guzy neuroendokryne, guzy torbielowate trzustki, przerzuty nowotworowe (np. raka piersi, raka jelita grubego) oraz nacieki nowotworowe z sąsiednich struktur (np. rak dróg żółciowych, chłoniak), jak i zmiany nienowotworowe, takie jak uszkodzenie przewodu trzustkowego w wyniku urazu, ostrego zapalenia trzustki, autoimmunologiczne zapalenie trzustki oraz torbiele rzekome trzustki. Rozpoznając zwężenie PT, należy zawsze pamiętać o potencjalnie złośliwej etiologii i dążyć do wyjaśnienia jego charakteru.[4]

## 1.3 Zwężenia dróg żółciowych

Zwężenia zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych (DŻ) mogą być spowodowane zarówno przez proces nowotworowy toczący się w trzustce, drogach żółciowych, pęcherzyku żółciowym, jak i przez zmiany łagodne. Do łagodnych przyczyn zwężeń DŻ należą kamica żółciowa przewodowa, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, uszkodzenia pooperacyjne, przewlekłe zapalenie trzustki.[5,6] Różnicowanie pomiędzy łagodnym a złośliwym charakterem zmiany stwarza wiele problemów klinicznych. Obecnie na podstawie badań obrazujących można dokładnie określić miejsce i stopień zwężenia DŻ. Bardzo często badania obrazowe nie wyjaśniają jednak etiologii zwężeń przewodów żółciowych. Dotyczy to nawet 50% pacjentów.[7]

Szczególnym przypadkiem zwężeń dróg żółciowych jest pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC – *primary sclerosing cholangitis*). Jest to przewlekła, cholestatyczna choroba wątroby o prawdopodobnie autoimmunologicznej etiologii. Charakteryzuje się zapaleniem i włóknieniem wewnątrz- i zewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, co prowadzi

do powstania wielopoziomowych zwężeń DŻ. PSC jest chorobą postępującą, w przebiegu której u większości pacjentów dochodzi do rozwoju marskości wątroby.[8] Zachorowalność na PSC zależy od regionu i wynosi od 0,1 na 100.000 w Europie Południowej i Azji do 0,9-1,3 na 100.000 w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i krajach Europy Północnej.[9] Ostatnio opublikowano doniesienie ukazujące wzrostowy trend zachorowalności na PSC w dorosłej populacji Szwedów.[10] PSC często współistnieje z nieswoistymi zapaleniami jelita (IBD – *inflammatory bowel disease*). Częstość występowania IBD wśród chorych na PSC wynosi 60-80%.[8,9] W tej grupie pacjentów u 48-86% rozpoznaje się wrzodziejące zapalenie jelita grubego, a u ok. 13% chorobę Crohna, która zazwyczaj obejmuje jelito grube.[8]

Bardzo istotnym problemem klinicznym u chorych na PSC jest zwiększone ryzyko zachorowania na raka dróg żółciowych (CCA – *cholangiocarcinoma*), które według różnych doniesień wynosi od 5% do 36% w ciągu całego życia.[9,11-13] Nie można przewidzieć rozwoju CCA na podstawie czasu trwania PSC, objawów, czy stopnia ciężkości choroby.[14] U około 50% chorych CCA jest wykrywany już w ciągu pierwszego roku od rozpoznania PSC.[8,9] Stopień zaawansowania choroby u większości pacjentów w momencie rozpoznania raka uniemożliwia radykalne leczenie chirurgiczne.[14] Szczególne wyzwanie stanowi różnicowanie CCA i łagodnego zwężenia dominującego u chorych z PSC. Zwężenie dominujące jest definiowane jako zwężenie przewodu żółciowego wspólnego do średnicy  $\leq 1,5$  mm lub przewodu wątrobowego do  $\leq 1$  mm.[8] Występuje często, jest stwierdzane u 45% do 58% chorych.[8] Pojawienie się zwężenia dominującego powinno zawsze budzić podejrzenie rozwoju CCA i skłaniać do bardziej inwazyjnej diagnostyki.[8,9] Obecnie zalecaną strategią postępowania u chorych ze zwężeniem dominującym jest wykonanie endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej (ECPW) z pobraniem wymazu szczoteczkowego i/lub biopsji z miejsca zwężenia.[8]



## 1.4 Rak trzustki

Okolo 95% nowotworów trzustki rozwija się z części zewnątrzwydzielniczej gruczołu. Wyróżnia się trzy główne typy nowotworów trzustki. Najczęściej rozpoznawany jest przewodowy rak gruczołowy, który stanowi ponad 90% raków trzustki. Rzadziej obserwuje się nowotwory torbielowate oraz guzy neuroendokrynne.[15] Gruczolakorak trzustki rozwija się z nieinwazyjnych zmian przednowotworowych, z których najczęstszą jest śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa (PanIN – *pancreatic intraepithelial neoplasia*).[2,16] Do progresji zmian w komórkach nabłonkowych przewodów trzustkowych od dysplazji małego stopnia (PanIN 1A i 1B), poprzez bardziej zaawansowaną dysplazję (PanIN 2 i 3), do raka inwazyjnego dochodzi równolegle z narastaniem liczby mutacji.[2] We wczesnych etapach onkogenezy następuje aktywacja onkogenu K-ras i skrócenie telomerów, natomiast inaktywacja genów supresorowych guza (CDKN2A, TP53, SMAD4 i BRCA2) jest stwierdzana w zaawansowanej neoplazji śródnabłonkowej.[16] Rak trzustki może powstać także na podłożu wewnątrzprzewodowego brodawkowego nowotworu śluzotwórczego (IPMN – *intraductal papillary mucinous neoplasm*) lub śluzowego nowotworu torbielowatego (MCN – *mucinous cystic neoplasm*).[2,16]

Rak trzustki stanowi około 2% nowotworów złośliwych, powodując około 3,5% zgonów z przyczyn nowotworowych.[17] Pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe znajduje się on na 13. miejscu, a pod względem śmiertelności na 8. Charakteryzuje się złym rokowaniem – wskaźnik śmiertelności dla tej choroby sięga 98%. Większa rozpoznawalność tego nowotworu w krajach rozwiniętych (61%) jest raczej związana z lepszą diagnostyką, niż z większą zachorowalnością.[18] Występuje z częstością 7-9 na 100.000 mężczyzn i 4,5-6 na 100.000 kobiet.[18] W latach 1920-1978 obserwowano trzykrotny wzrost zachorowalności na raka trzustki w Stanach Zjednoczonych,[18] jednak w ostatnich latach (1990-2005) częstość występowania raka trzustki w populacji amerykańskich mężczyzn utrzymuje się na stałym poziomie, podczas gdy wśród amerykańskich kobiet nadal rośnie.[19]

Z kolei w krajach europejskich opisywana jest stała tendencja wzrostowa zapadalności na ten nowotwór.[20] Ryzyko zachorowania na raka trzustki rośnie wraz z wiekiem i osiąga szczyt w 7. i 8. dekadzie życia.[2,21,22]

Opisywano wiele potencjalnych czynników ryzyka rozwoju raka trzustki. Za jedyny środowiskowy czynnik ryzyka tego nowotworu o udowodnionym znaczeniu uważa się palenie papierosów.[2] Szacuje się, że odpowiada ono za 25-30% przypadków raka trzustki.[21,23] Ryzyko rozwoju tego nowotworu jest 2,5 do 3,6 razy większe u palaczy niż u osób niepalących.[2] Do czynników ryzyka raka trzustki należą również uwarunkowania genetyczne, które odpowiadają za rozwój tego nowotworu u 10-15% chorych.[3] Do zespołów genetycznych związanych ze zwiększonym ryzykiem raka trzustki należą genetycznie uwarunkowane przewlekłe zapalenie trzustki, dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, zespół Peutz-Jeghersa, rodzinny rak sutka.[21] U pacjentów z wieloletnim przebiegiem przewlekłego zapalenia trzustki również wzrasta ryzyko rozwoju tego nowotworu.[24,25] Obserwowano również wzrost zachorowalności u osób spożywających nadmierne ilości tłuszczów zwierzęcych, szczególnie potraw grillowanych i stwierdzono ochronną rolę diety bogatej w owoce i warzywa.[21]

Rak trzustki charakteryzuje się złym rokowaniem, z 5-letnim przeżyciem nieprzekraczającym 5%.[19] W momencie rozpoznania choroby zaledwie u 15-20% chorych nowotwór jest resekcyjny.[16] Jednak nawet w najlepiej wyselekcjonowanej grupie pacjentów 5-letnie przeżycie po leczeniu operacyjnym wynosi maksymalnie 20%.[21] U chorych z guzem resekcyjnym mediana czasu przeżycia wynosi 17-23 miesięcy, w przypadku choroby miejscowo zaawansowanej jest to 8-14 miesięcy, a u pacjentów z odległymi przerzutami (ok. 60% chorych w chwili rozpoznania) zaledwie 4-6 miesięcy.[16] Ponieważ rak trzustki jest oporny na chemio- i radioterapię, wczesne postawienie prawidłowego rozpoznania umożliwiające leczenie operacyjne ma kluczowe znaczenie dla dalszego rokowania. Gruczolakorak trzustki wywodzący się z nabłonka przewodów trzustkowych często powoduje ich zwężenie we

wczesnym okresie choroby. Stwarza przez to potencjalną szansę wczesnego rozpoznania nowotworu w oparciu o analizę wymazów szczoteczkowych pod kątem zmian cytologicznych i molekularnych.

Dodatkowe wyzwanie diagnostyczne stanowi wczesne rozpoznanie raka trzustki u osób z wieloletnim przebiegiem przewlekłego zapalenia trzustki.[26] Ponieważ obraz kliniczny przewlekłego zapalenia trzustki i raka trzustki może być podobny, natomiast rokowanie i leczenie obu tych chorób różni się zasadniczo, istotne jest przeprowadzenie odpowiedniej diagnostyki różnicowej.

### **1.5 Badania obrazowe w diagnostyce raka trzustki**

Badania obrazowe odgrywają istotną rolę w diagnostyce raka trzustki. Umożliwiają one zarówno rozpoznanie choroby, jak i określenie stopnia zaawansowania nowotworu oraz ocenę resekcyjności guza. Metody obrazujące stosowane w diagnostyce raka trzustki to ultrasonografia przezbrzuszną (USG), wielorzędowa tomografia komputerowa ze wzmocnieniem kontrastowym (TK), endoskopowa ultrasonografia (EUS), rezonans magnetyczny (MRI – *magnetic resonance imaging*), cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego (MRCP – *magnetic resonance cholangiopancreatography*), endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna (ECPW) i pozytonowa tomografia emisyjna (PET – *positron emission tomography*).[27]

Pierwszym badaniem obrazowym wykonywanym u pacjentów z objawami sugerującymi raka trzustki jest zwykle USG, ponieważ jest to badanie szeroko dostępne, stosunkowo niedrogi i nieinwazyjne. Czułość tej metody zależy jednak istotnie od wielkości guza i waha się od 44% w przypadku mniejszych zmian do 95% w przypadku guzów przekraczających 3 cm średnicy.[3,27] Na jej wynik mogą wpłynąć także warunki anatomiczne pacjenta i umiejętności badającego. Jest uważana za dobre wstępne badanie diagnostyczne u pacjentów z podejrzeniem raka trzustki, ponieważ umożliwia także

zobrazowanie poszerzenia dróg żółciowych, powiększenia węzłów chłonnych i obecności przerzutów do wątroby. [26,27]

Wielorzędowa tomografia komputerowa ze wzmocnieniem kontrastowym (TK) jest badaniem z wyboru służącym do oceny stopnia zaawansowania i resekcyjności raka trzustki. Jej czułość w wykrywaniu małych guzów trzustki (<2 cm) wynosi 72-77%, a swoistość sięga 100%.[27,28] Pozwala na ocenę naciekania sąsiadujących naczyń z czułością i swoistością sięgającą 94% oraz umożliwia określenie resekcyjności guza z dokładnością rzędu 80-90%.[29] U około 60% chorych z rakiem trzustki stwierdza się poszerzenie przewodu trzustkowego i/lub żółciowego w związku z zamknięciem lub zwężeniem tych przewodów przez nowotwór, jednak podobny obraz może być spowodowany guzem zapalnym głowy trzustki w przebiegu przewlekłego zapalenia.[26,27]

Endoskopowa ultrasonografia (EUS) jest uważana za najbardziej dokładną metodę oceny trzustki. Jej dostępność nie jest jednak powszechna ze względu na wysoki koszt aparatury i niezbędne wysokie kwalifikacje osoby badającej. Pozwala wykryć zmiany ogniskowe w trzustce wielkości 2-3 mm.[27] Jej czułość w wykrywaniu guzów o średnicy poniżej 2 cm sięga 97%.[27,30] Swoistość EUS jest ograniczona w przypadku współistnienia zmian zapalnych w trzustce. Wartość predykcyjną wyniku dodatniego EUS w wykrywaniu raka trzustki u pacjentów z przewlekłym zapaleniem tego narządu wyliczono na 60%.[27]

Szczególną rolę w rozpoznaniu różnicowym zmian ogniskowych trzustki odgrywa biopsja aspiracyjna cienkoigłowa pod kontrolą EUS (EUS-FNA – *EUS-guided fine needle aspiration*). W rękach doświadczonego endoskopisty metoda ta osiąga czułość 75-90% i swoistość 94-100%.[30] Nie obserwowano rozsiewu nowotworu do otrzewnej lub w kanale igły biopsyjnej w wyniku EUS-FNA, podczas gdy istnieją doniesienia o wystąpieniu takich powikłań po biopsji przezskórnej.[22] W związku z tym u pacjentów z potencjalnie resekcyjnym guzem trzustki należy unikać biopsji przezskórnej. W ostatnich latach opracowano technikę wykonywania biopsji gruboigłowej pod kontrolą EUS

(biopsja Trucut), która charakteryzuje się większą dokładnością w rozpoznawaniu raka trzustki niż EUS-FNA. Opisywano przydatność tej metody w diagnostyce guzów trzonu i ogona trzustki ze względu na dobry dostęp do zmian przez ścianę żołądka. Natomiast w przypadku guzów głowy trzustki wysokie ryzyko krwawienia ogranicza użyteczność biopsji Trucut.[31]

W celu poprawy nieinwazyjnej diagnostyki zmian ogniskowych w trzustce w ostatnich latach skupiono się na rozwoju nowych technik uzupełniających EUS: elastografii EUS i EUS dopplerowskiemu ze wzmocnieniem kontrastowym.[32,33] Elastografia jest metodą wykorzystywaną do oceny sztywności tkanek w czasie rzeczywistym, co pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji na temat charakterystyki badanego narządu w stosunku do konwencjonalnej EUS. Za pomocą elastografii określa się stopień odkształcenia tkanek pod wpływem ucisku. Guzy nowotworowe mają inne właściwości mechaniczne niż zdrowe narządy.[32] Obrazy elastograficzne ukazują elastyczność tkanek, która koreluje z cechami histopatologicznymi, dlatego też metoda ta bywa nazywana „wirtualną biopsją”. [34] Elastografia EUS może poprawić diagnostykę zmian ogniskowych w trzustce, a szczególnie różnicowanie pomiędzy guzem zapalnym trzustki a rakiem trzustki w przypadku ujemnej EUS-FNA.[33] Według doniesień oceniających rolę elastografii w diagnostyce zmian ogniskowych trzustki metoda ta charakteryzuje się czułością 92,3-100% przy swoistości 63,8-93%.[32-35] Autorzy tych prac twierdzą, że elastografia EUS nie może zastąpić EUS-FNA w różnicowaniu łagodnych i złośliwych guzów trzustki, może jednak być przydatna w przypadku ujemnych wyników EUS-FNA lub trudności technicznych w wykonaniu EUS-FNA.[34,35] Elastografia może też ułatwić wybór odpowiedniego miejsca nakłucia podczas wykonywania EUS-FNA.[33,35]

W ostatnich latach dzięki wynalezieniu dożylnych środków kontrastowych wzmacniających sygnał ultradźwiękowy rozwinęła się EUS ze wzmocnieniem kontrastowym (CE-EUS – *contrast-enhanced endoscopic ultrasound*). Pozwala ona na lepszą ocenę przepływów naczyniowych w EUS dopplerowskim w

czasie rzeczywistym, szczególnie w przypadku zmian charakteryzujących się wolnym przepływem krwi, takich jak rak trzustki.[32,33] Uzyskano obiecujące wyniki w różnicowaniu guzów zapalnych i nowotworowych trzustki przy użyciu CE-EUS – czułość metody oceniono na 80-94%, a swoistość na 82-100%.[32,33] Rak trzustki jest widoczny jako zmiana hypoechogeniczna, w przeciwieństwie do guzów zapalnych (hiperechogenicznych) i neuroendokrynnych (izoechogenicznych).[33] Dokładna ocena roli CE-EUS w diagnostyce różnicowej zmian ogniskowych trzustki wymaga dalszych badań wieloośrodkowych.

Endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna (ECPW) jest najlepszym badaniem służącym do oceny anatomii przewodu trzustkowego i dróg żółciowych. Jest to procedura inwazyjna, wymagająca dużych umiejętności badającego i obciążona ryzykiem powikłań sięgającym 5-10%, co ogranicza jej rutynowe zastosowanie w celach wyłącznie diagnostycznych.[3] Obecnie jest głównie zarezerwowana dla chorych wymagających oprócz diagnostyki, również endoskopowych działań terapeutycznych takich jak poszerzanie mechaniczne zwężeń w przewodzie trzustkowym i/lub drogach żółciowych oraz ich protezowanie.[3,26,36] Ponadto umożliwia także rozszerzenie diagnostyki o pobranie materiału do badań cytologicznych i molekularnych, ponieważ pozwala na uzyskanie soku trzustkowego oraz wykonanie wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych.[2,4,27]

Cholangiopankreatografia rezonansu magnetycznego (MRCP) pozwala wykryć zwężenia przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych z podobną czułością co ECPW, jednak jest mniej dokładna w rozpoznawaniu zmian złośliwych.[27] Czułość MRCP w wykrywaniu raka trzustki oceniano na 83-87%, a swoistość na 81-100%.[3] Do zalet MRCP należy jej nieinwazyjność oraz możliwość zobrazowania przewodów trzustkowych i dróg żółciowych u pacjentów, u których nie można wykonać ECPW np. po gastrektomii metodą Billroth II.[27]

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) pozwala na wykrycie raka trzustki z czułością 71-92% i swoistością 64-94%, jednak w niejasnych przypadkach nie dostarcza więcej informacji niż TK. Charakteryzuje się wysoką czułością w obrazowaniu przerzutów nowotworowych. W związku z tym, że korzyści płynące z zastosowania PET przy wątpliwościach diagnostycznych są ograniczone, a koszt badania wysoki, nie jest powszechnie stosowane w diagnostyce raka trzustki.[27]

## **1.6 Rak dróg żółciowych**

Rak dróg żółciowych (CCA) stanowi ok. 3% nowotworów przewodu pokarmowego.[37] Jest najczęściej stwierdzany w 7. dekadzie życia, rzadko pojawia się przed 40. rokiem życia. Stosunek zachorowalności wśród kobiet i mężczyzn wynosi 1:1,2-1,5. Częstość występowania CCA różni się w zależności od obszaru geograficznego, co jest najprawdopodobniej związane z różnicami pomiędzy występowaniem czynników ryzyka tego nowotworu.[37-39] Do uznanych czynników ryzyka należą pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, torbiele dróg żółciowych, kamica dróg żółciowych, pasożyty dróg żółciowych (zwłaszcza w południowo-zachodniej Azji), narażenie na toksyny.[11,38,39] Za potencjalne czynniki ryzyka CCA uważa się nieswoiste zapalne choroby jelit, wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, marskość wątroby, otyłość, nadużywanie alkoholu.[38,39]

Rokowanie w CCA jest złe. Odsetek 5-letnich przeżyć wynosi 5-10%. Jediną skuteczną metodą leczenia tego nowotworu jest zabieg operacyjny, jednak w chwili rozpoznania większość pacjentów nie kwalifikuje się do resekcji guza. Odsetek 5-letnich przeżyć u chorych leczonych chirurgicznie zależy od lokalizacji nowotworu i wynosi 9-18% w przypadku zmian położonych proksymalnie, a 20-30% w guzach zlokalizowanych dystalnie.[40]

## 1.7 Badania obrazowe w diagnostyce raka dróg żółciowych

Rak dróg żółciowych często szerzy się wzdłuż przewodów żółciowych, a nie na zewnątrz w formie guza, co znacznie utrudnia jego identyfikację w badaniach obrazowych.[1] Ultrasonografia jest zwykle pierwszym badaniem wykonywanym u pacjentów z żółtaczką. Jej czułość w wykrywaniu tego nowotworu jest niska, pozwala jednak uwidocznić poszerzenie dróg żółciowych oraz wykluczyć kamice żółciową.

Tomografia komputerowa z kontrastem cechuje się czułością 59% w identyfikacji ogniska pierwotnego CCA, ale umożliwia ocenę zaawansowania nowotworu (ocena węzłów chłonnych, miąższu wątroby, naciekania dużych naczyń).[1]

Rezonans magnetyczny podobnie jak TK pozwala na określenie stopnia zaawansowania CCA, a MRCP jest nieinwazyjną metodą oceny dróg żółciowych poniżej i powyżej miejsca zwężenia.[1,40] Wprowadzenie protezy do dróg żółciowych może powodować zwiększone wzmocnienie kontrastem gadolinowym ściany przewodów, co może być interpretowane jako szerzenie się raka wzdłuż ścian. Aby uniknąć takich wątpliwości diagnostycznych należy wykonywać MRCP przed protezowaniem przewodów żółciowych.[1]

Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) nie cechuje się wysoką dokładnością w wykrywaniu CCA w przypadku zewnątrzwątrobowych zwężeń dróg żółciowych. Może to być związane z małym rozmiarem guza. Ograniczeniem PET są także wyniki fałszywie dodatnie u pacjentów z ropnym zapaleniem dróg żółciowych, pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych i po protezowaniu przewodów żółciowych.[1]

U pacjentów z bezbólową żółtaczką związaną ze zwężeniem dróg żółciowych i bez ewidentnego guza w badaniach obrazujących, procedurą diagnostyczną z wyboru jest ECPW.[40,41] Pozwala ono na ocenę morfologii zwężenia oraz pobranie materiału do badania cytologicznego i badań molekularnych, tak jak w przypadku opisywanych powyżej zwężeń spowodowanych przez raka trzustki, a



także na działania terapeutyczne, takie jak poszerzenie mechaniczne zwężenia i protezowanie dróg żółciowych.

### 1.8 Markery surowicze

Spośród surowiczych markerów nowotworowych oznaczanych w diagnostyce raka trzustki i dróg żółciowych najszerzej przebadane zostały CA 19-9 (antygen rakowy - *cancer antigen 19-9* lub *carbohydrate antigen 19-9*) i CEA (antygen płodowo-rakowy – *carcinoembryonic antigen*). Nie są one niestety swoiste dla tych nowotworów. Wzrost stężenia CA 19-9 obserwuje się także w przypadku przewlekłego zapalenia trzustki, cholestazy, zapalenia dróg żółciowych, marskości wątroby, raka jelita grubego i żołądka,[1,2,22,42] a CEA m.in. u pacjentów z rakiem jelita grubego, żołądka, płuc, piersi, czy tarczycy.[43]

Czułość CA 19-9 w rozpoznawaniu raka trzustki sięga 80%, a swoistość 60-70%. Wzrost stężenia tego markera obserwuje się zwykle u pacjentów z guzem o wymiarach  $\geq 3$  cm, co ogranicza jego zastosowanie we wczesnej diagnostyce zmian potencjalnie resekcyjnych.[22] Ponadto osoby, które nie mają antygenu Lewis a lub b, nie są w stanie syntetyzować antygenu CA 19-9. W związku z tym marker ten jest u nich niewykrywalny nawet w zaawansowanym stadium choroby. Dotyczy to ok. 10% chorych z rakiem trzustki. CA 19-9 nie ułatwia więc rozpoznania etiologii zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych w wątpliwych przypadkach, jest natomiast jedynym markerem użytecznym w monitorowaniu pacjentów po leczeniu.[2] Z kolei czułość i swoistość CEA w diagnostyce raka trzustki są jeszcze niższe, osiągając odpowiednio 58% i 50-70%.[3]

W przypadku raka dróg żółciowych stężenie CA 19-9 powyżej 100 U/ml pozwala na rozpoznanie choroby z czułością 53-67,5% i swoistością 86,8% u pacjentów bez pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (PSC – primary sclerosing cholangitis) oraz odpowiednio 89% i 86% u chorych z PSC.[1,40] Jednoczesne oznaczanie CA 19-9 i CEA u pacjentów z PSC

umożliwia rozpoznanie progresji choroby do raka z czułością 67% i swoistością 100%. [40]

### **1.9 Cytologia i wymazy szczoteczkowe**

W razie wątpliwości co do charakteru zwężenia przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych istotnym etapem procesu diagnostycznego jest uzyskanie materiału do badań cytologicznych. U chorych, u których nie stwierdza się ewidentnego guza w badaniach obrazowych, nie ma możliwości wykonania biopsji przezskórnej, ani pod kontrolą EUS. Ponadto biopsja przezskórna jest związana z potencjalnym ryzykiem rozsiewu komórek nowotworowych w kanale igły lub do otrzewnej, w związku z tym powinno się jej unikać u pacjentów z potencjalnie resekcyjnym guzem. [44]

Najstarszą i najprostszą metodą uzyskiwania materiału do badań cytologicznych podczas ECPW u chorych ze zwężeniem dróg żółciowych jest aspiracja żółci. Mimo swoistości ocenianej na 100%, charakteryzuje się ona bardzo niską czułością w granicach 6-32%. W związku z tym, że czułość innych technik endoskopowych pobierania materiału cytologicznego jest wyższa, aspiracja żółci powinna być zarezerwowana tylko dla pacjentów, u których nie można zastosować innych metod. [45] Z kolei według nielicznych doniesień oceniających przydatność cytologii soku trzustkowego w diagnostyce raka trzustki, cechuje się ona wyższą czułością w granicach 58-67% przy swoistości 100%. [46,47]

Spośród endoskopowych technik pobierania materiału ze zwężeń dróg żółciowych do badań cytologicznych najwyższą czułością charakteryzuje się wewnątrzprzewodowa biopsja szczypczykami. Wynosi ona 43-81% przy swoistości 97-100%. Jej zastosowanie jest jednak znacznie ograniczone, ponieważ jest to metoda trudna technicznie i czasochłonna. [48]

Istnieją również doniesienia na temat prób oceny cytologicznej materiału pobranego ze stentów żółciowych i trzustkowych w diagnostyce nowotworów trzustki i dróg żółciowych. W przypadku endoprotez trzustkowych czułość tej metody wynosi 25%, swoistość 100%, a w przypadku stentów żółciowych odpowiednio 11% i 100%. W związku z bardzo niską czułością przydatność tej metody w praktyce jest bardzo ograniczona. Ponadto opóźnienie w ewentualnym rozpoznaniu nowotworu związane z odstępem czasowym pomiędzy wprowadzeniem stentu, a jego usunięciem i badaniem cytologicznym, również przemawia przeciwko wykorzystaniu tej metody w praktyce klinicznej.[49]

Obecnie najbardziej rozpowszechnioną techniką endoskopowego uzyskiwania materiału ze zwężeń dróg żółciowych są wymazy szczoteczkowe. Metoda ta została po raz pierwszy opisana w 1975 roku.[50] Jest ona łatwiejsza technicznie i mniej czasochłonna niż wewnątrzprzewodowa biopsja szczypczykami. Jest też uważana za metodę stosunkowo bezpieczną, niezwiększającą istotnie ryzyka powikłań po ECPW.[48] Cechuje się wysoką swoistością rzędu 90-100% przy czułości w granicach 15-60%.[1,48,51,52] Za pomocą wymazów szczoteczkowych można także pobrać materiał cytologiczny ze zwężeń przewodu trzustkowego. W tym przypadku czułość badania wynosi 33,3-81,8% przy swoistości 97-100%.[52-55] Jest to metoda mniej rozpowszechniona niż wymazy szczoteczkowe ze zwężeń dróg żółciowych, ponieważ manipulacje w obrębie przewodu trzustkowego są trudniejsze technicznie niż w drogach żółciowych.[46]

### **1.10 Markery molekularne**

W związku z niezadowalającą czułością wymazów szczoteczkowych podejmowano próby poprawy ich czułości poprzez badania nowotworowych markerów molekularnych w uzyskiwanym materiale ze zwężeń przewodu

trzustkowego i/lub dróg żółciowych. Badano m.in. obecność mutacji genu K-ras, p53 oraz zwiększonej aktywności telomerazy.

Mutacja genu K-ras jest stwierdzana na wczesnym etapie kancerogenezy raka trzustki i jest obecna u 75-100% chorych na ten nowotwór.[26] Jest również obserwowana w 41-100% przypadków raka dróg żółciowych,[56] gdzie koreluje ze złym rokowaniem.[40] Niestety występuje także u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki, a rozpowszechnienie opisywanej mutacji w tej grupie sięga nawet 40%.[57,58] Wywiera to niekorzystny wpływ na swoistość tego markera w diagnostyce etiologii zwężeń przewodów trzustkowych i/lub żółciowych, mimo że według niektórych doniesień oznaczanie mutacji K-ras poprawia czułość cytologii.[59,60] W związku z tym rola badania opisywanej mutacji w diagnostyce zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych jest ograniczona, a w szczególności nie jest użyteczne w diagnostyce różnicowej zmian nowotworowych i zapalnych trzustki[46,57,58] oraz w rozpoznawaniu raka dróg żółciowych.[56] Ponadto oznaczanie mutacji genu K-ras wykonywane jest metodą PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy - *polimerase chain reaction*), do której wymagany jest specjalistyczny sprzęt i doświadczenie, co ogranicza jej powszechne zastosowanie.[61]

Do mutacji genu p53 dochodzi na późnym etapie kancerogenezy i stwierdza się ją w 40-75% przypadków raka trzustki.[26] Występuje również u pacjentów z rakiem dróg żółciowych i jest związana z niższym odsetkiem odległych przeżyć w tej grupie chorych.[40] Według niektórych doniesień badanie immunohistochemiczne na obecność mutacji genu p53 w materiale z wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych zwiększa czułość cytologii nie wpływając niekorzystnie na swoistość,[62,63] jednak w innych badaniach nie wykazano korzyści z zastosowania tej metody diagnostycznej.[61,64] Opisywano także wyniki fałszywie dodatnie u chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki.[61] W związku z tym wartość kliniczna określenia obecności mutacji genu p53 w wymazach szczoteczkowych ze

zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych pozostaje obecnie niejasna i wymaga dalszych badań.

Zwiększoną aktywność telomerazy wykrywa się w około 85-90% ludzkich nowotworów, podczas gdy nie stwierdza się jej w normalnych komórkach somatycznych poza komórkami tkanek regenerujących się, takich jak np. hematopoetyczne komórki macierzyste.[65,66] W związku z tym oznaczanie aktywności telomerazy cechuje się wyższą swoistością niż obecność mutacji K-ras w diagnostyce nowotworowych zwężeń przewodu trzustkowego i/lub dróg żółciowych.[66,67] Ograniczeniem zastosowania tej metody diagnostycznej może być, jak w przypadku K-ras technika oznaczania aktywności telomerazy za pomocą PCR.

### **1.11 Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ***

W ostatnich latach opublikowano kilka prac opisujących zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH – *fluorescence in situ hybridization*) w diagnostyce zwężeń dróg żółciowych.[51,68,69] Według autorów tych doniesień FISH może być użytecznym narzędziem diagnostycznym poprawiającym czułość rutynowej cytologii w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń dróg żółciowych spowodowanych przez raka trzustki, raka dróg żółciowych i inne nowotwory.[51,68,69] Niestabilność chromosomalna jest jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych. Prowadzi do zaburzeń w postaci aneuploidii (nieprawidłowa liczba chromosomów w jądrze komórkowym) i/lub nieprawidłowej struktury chromosomów (np. delecja lub amplifikacja genu).[6] Zaburzenia chromosomalne są obserwowane w około 80% przypadków raka dróg żółciowych i trzustki.[70,71] FISH jest używana rutynowo do wykrywania raka pęcherza moczowego w próbkach moczu chorych z krwimoczem lub monitorowania pacjentów leczonych z powodu raka pęcherza moczowego pod kątem nawrotu choroby.[69,72,73] Może być również stosowana w rozpoznawaniu raka płuc w wymazach szczoteczkowych z oskrzeli oraz dysplazji lub raka gruczołowego w wymazach endoskopowych u

pacjentów z przełykiem Barretta.[69] Technika ta polega na przyłączeniu fluorescencyjnie znakowanych sond jednoniciowego DNA do komplementarnych sekwencji docelowych na specyficznych chromosomach w jądrach interfazowych komórek. Efekt hybrydyzacji sond molekularnych z DNA chromosomów jest widoczny w postaci kolorowych sygnałów w jądrach komórkowych (w zależności od koloru emitowanego przez dołączony do sondy fluorofor) dzięki użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji. Analiza liczby sygnałów jest przeprowadzana przez cytogenetyka.[69]

W dotychczasowych badaniach do wykrywania zaburzeń chromosomalnych w materiale uzyskanym dzięki wymazom szczoteczkowym zwężeń dróg żółciowych korzystano z zestawu sond używanego rutynowo do diagnostyki raka pęcherza moczowego w próbkach moczu. Składa się on z czterech sond DNA znakowanych fluoroforami. Trzy z nich łączą się z centromerami chromosomów 3, 7 i 17 (CEP – *Chromosome Enumeration Probe*), a jedna jest sondą specyficzną dla locus 9p21 (LSI – *Locus Specific Identifier*), która łączy się z genem p16 w locus 9p21. Dzięki sondom CEP można ocenić liczbę chromosomów 3, 7 i 17 obecnych w komórce, natomiast sonda LSI 9p21 pozwala określić liczbę kopii locus 9p21 na chromosomie 9, a więc liczbę chromosomów 9 w jądrze komórkowym.[6,51,68,69]

Według autorów doniesień oceniających rolę FISH w diagnostyce zwężeń dróg żółciowych jest to obiecująca technika poprawiająca czułość rutynowej cytologii wymazów szczoteczkowych. Dotychczas nie oceniano natomiast przydatności tej metody w wykrywaniu nowotworowej etiologii zwężeń przewodu trzustkowego głównego. Ilościowe zaburzenia chromosomalne stwierdzone w raku trzustki dotyczą chromosomów 3, 5, 7, 9, 13, 17, 18 i 22.[71] Ponieważ złośliwe zwężenia dróg żółciowych są przeważnie spowodowane naciekaniem raka trzustki, użycie tego samego zestawu sond molekularnych w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń przewodu trzustkowego wydaje się uzasadnione.

## 2. CELE PRACY

1. Ocena przydatności cytologii soku trzustkowego w diagnostyce różnicowej zwężeń przewodu trzustkowego głównego.
2. Ocena przydatności wymazów szczoteczkowych w diagnostyce różnicowej zwężeń przewodu trzustkowego głównego:
  - 2.1. Ocena czułości, swoistości, wartości predykcyjnej wyniku dodatniego i wartości predykcyjnej wyniku ujemnego cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego.
  - 2.2. Porównanie przydatności cytologii ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego z cytologią ze zwężeń dróg żółciowych.
  - 2.3. Ocena czułości, swoistości, wartości predykcyjnej wyniku dodatniego i wartości predykcyjnej wyniku ujemnego fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego.
  - 2.4. Porównanie przydatności FISH wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego z FISH wymazów szczoteczkowych ze zwężeń dróg żółciowych.
  - 2.5. Porównanie przydatności rutynowej cytologii i FISH w diagnostyce zwężeń przewodu trzustkowego głównego.
  - 2.6. Ocena wpływu zakwalifikowania atypii do wyników dodatnich lub ujemnych na czułość, swoistość, wartość predykcyjną wyniku dodatniego i wartość predykcyjną wyniku ujemnego cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego i dróg żółciowych.

### **3. MATERIAŁ I METODY**

Praca była finansowana z grantu promotorskiego Narodowego Centrum Nauki numer N402 178935. Jest to prospektywne badanie kohortowe, na które uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

#### **3.1. Materiał**

Badanie prowadzono od lutego 2006 do grudnia 2011 roku. Do badania kwalifikowano chorych hospitalizowanych w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z rozpoznaniem zwężeniem przewodu trzustkowego głównego (PT) i/lub dróg żółciowych (DŻ) na podstawie tomografii komputerowej ze wzmocnieniem kontrastowym (TK) lub/i cholangiopankreatografii rezonansu magnetycznego (MRCP) lub pacjentów, u których stwierdzono zwężenia PT i/lub DŻ podczas endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej (ECPW) wykonywanej z innych wskazań. Chorzy wyrazili świadomą zgodę na proponowane procedury diagnostyczne i terapeutyczne. Analizie poddano wyniki chorych, u których udało się ustalić ostateczne rozpoznanie charakteru zwężenia na podstawie badania histopatologicznego lub w toku dalszej obserwacji (stwierdzana progresja choroby rozrostowej w postaci powiększania się guza, obecności przerzutów i/lub zgonu z powodu choroby nowotworowej).

Do badania zakwalifikowano 151 chorych: 73 kobiety i 78 mężczyzn, w wieku 19-91 lat (średnia wieku 62,92 lata, mediana 64 lata, moda 73 lata). Stwierdzono 64 zwężenia PT (29 złośliwych, 35 łagodnych) i 87 zwężeń DŻ (65 złośliwych, 22 łagodne). Materiał do badania cytologicznego uzyskano u 148 chorych, a materiał do badania techniką FISH pobrano od 81 pacjentów. W przypadku 14 chorych z grupy FISH uzyskane preparaty były niediagnostyczne, w związku z czym ostatecznej analizie poddano wyniki FISH 67 pacjentów. Charakterystyka badanej populacji została przedstawiona w tabeli 1.



**Tabela 1.** Charakterystyka chorych.

	<b>Cała grupa</b>	<b>Cytologia</b>	<b>FISH</b>
<b>Liczba chorych, n</b>	151	148	67
<b>Płeć - K:M, n (%)</b>	73:78 (48,34:51,66)	71:77 (47,97:52,03)	36:31 (53,73:46,27)
<b>Średni wiek, lata (przedział)</b>	62,92 (19-91)	62,87 (19-91)	63,34 (28-91)
<b>Zwężenia PT, n (%)</b>	64 (42,38)	62 (41,89)	31 (46,27)
<b>Zwężenia DŻ, n (%)</b>	87 (57,62)	86 (58,11)	36 (53,73)
<b>Poszerzanie zwężenia, n (%)</b>	40 (26,49)	39 (26,35)	24 (35,82)

n – liczba pacjentów, K – kobiety, M – mężczyźni, PT – przewód trzustkowy, DŻ – drogi żółciowe, FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

W przypadku zwężeń PT lokalizację zmian obserwowanych w czasie ECPW opisywano jako zwężenie w głowie, cieśni lub trzonie. Nie stwierdzono zwężeń PT w ogonie trzustki. W przypadku DŻ zwężenia dzielono na zlokalizowane w części proksymalnej, środkowej i dystalnej. Lokalizacja stwierdzanych zwężeń została przedstawiona w tabeli 2.

**Tabela 2.** Lokalizacja zwężeń przewodu trzustkowego i dróg żółciowych.

	<b>Cała grupa</b>	<b>Cytologia</b>	<b>FISH</b>
<b>Przewód trzustkowy, n (%)</b>	64/151 (42,38)	62/148 (41,89)	31/67 (46,27)
<b>Głowa, n (%)</b>	49/64 (76,56)	47/62 (75,81)	24/31 (77,42)
<b>Cieśń, n (%)</b>	5/64 (7,81)	5/62 (8,06)	3/31 (9,68)
<b>Trzon, n (%)</b>	10/64 (15,63)	10/62 (16,13)	4/31 (12,9)
<b>Drogi żółciowe, n (%)</b>	87/151 (57,62)	86/148 (58,11)	36/67 (53,73)
<b>Proksymalna, n (%)</b>	22/87 (25,29)	22/86 (25,58)	7/36 (19,44)
<b>Środkowa, n (%)</b>	16/87 (18,39)	15/86 (17,44)	5/36 (13,89)
<b>Dystalna, n (%)</b>	49/87 (56,32)	49/86 (56,96)	24/36 (66,67)

n – liczba pacjentów, FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Potwierdzenie histopatologiczne ostatecznych rozpoznań na podstawie badania pooperacyjnego lub biopsji uzyskano u 69/151 chorych (45,7%). U pozostałych pacjentów rozpoznanie stawiano w oparciu o obraz kliniczny, wyniki badań obrazowych oraz obserwowaną progresję choroby nowotworowej. Czas obserwacji u tych chorych wynosił od 1 do 65 miesięcy (średnia 21,36 miesięcy, mediana 18 miesięcy). Etiologię zwężeń przewodu trzustkowego (PT) i dróg żółciowych (DŻ) przedstawiono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Etiologia zwężeń przewodu trzustkowego (PT) i dróg żółciowych (DŻ).

Rozpoznanie	PT i DŻ, n (%)	PT, n (%)	DŻ, n (%)
<b>Złośliwe</b>	94/151 (62,25)	29/94 (30,85)	65/94 (69,15)
Rak trzustki	49/94 (52,13)	26/29 (89,65)	23/65 (35,38)
Rak dróg żółciowych	23/94 (24,47)	0	23/65 (35,38)
Rak pęcherzyka żółciowego	9/94 (9,57)	1/29 (3,45)	8/65 (12,31)
Rak brodawki Vatera	7/94 (7,45)	1/29 (3,45)	6/65 (9,23)
Inne nowotwory*	6/94 (6,38)	1/29 (3,45)	5/65 (7,7)
<b>Łagodne</b>	57/151 (37,75)	35/57 (61,4)	22/57 (38,6)
Przewlekłe zapalenie trzustki	37/57 (64,91)	29/35 (82,86)	8/22 (36,36)
Ostre zapalenie trzustki	6/57 (10,53)	5/35 (14,28)	1/22 (4,55)
Kamica żółciowa	3/57 (5,26)	0	3/22 (13,64)
Po zabiegach chirurgicznych	4/57 (7,02)	0	4/22 (18,18)
Brodawczak brodawki Vatera	4/57 (7,02)	0	4/22 (18,18)
PSC	2/57 (3,51)	0	2/22 (9,09)
MCN	1/57 (1,75)	1/35 (2,86)	0

n – liczba pacjentów, PT – przewód trzustkowy, DŻ – drogi żółciowe, PSC – pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, MCN – śluzowy nowotwór torbielowaty trzustki (torbielakogruczolak śluzowy trzustki)

\*Inne nowotwory: przerzutowy rak płuca, rozsiały czerniak złośliwy, chłoniak.

### **3.2 Metody**

Materiał do badania pobierano w czasie endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej (ECPW). Sok trzustkowy aspirowano strzykawką przez cewnik wprowadzony do PT po przewodniku. Uzyskany sok odwirowywano, zlewano supernatant, a z uzyskanego osadu wykonywano cztery rozmazy na szkiełku podstawowym. Uzyskane preparaty niezwłocznie utrwalano w 70% alkoholu, a następnie przekazywano do Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie były one barwione metodą hematoksylina-eozyna, a następnie oceniane przez doświadczonych patologów.

W celu wykonania wymazu szczoteczkowego do przewodu trzustkowego w miejsce jego zwężenia wprowadzano po przewodniku szczoteczkę. Zwężenia nie były poszerzane rutynowo przed pobraniem wymazu, ponieważ doniesienia na temat korzyści płynących z tej procedury w celu poprawy czułości cytologii są niejednoznaczne.[74-76] Poszerzanie mechaniczne wykonywano jednak w przypadku ciasnych zwężeń, aby umożliwić wprowadzenie szczoteczki i przeprowadzenie dalszych procedur terapeutycznych. Pankreatografia przedstawiająca pobieranie wymazu szczoteczkowego ze zwężenia PT w trzonie u chorego z rakiem trzustki znajduje się na rycinie 1.



**Rycina 1.** Endoskopowa cholangiopancreatografia wsteczna (ECPW): pankreatografia ukazująca pobieranie wymazu szczoteczkowego ze zwężenia PT u chorego z rakiem trzonu trzustki (strzałka wskazuje szczoteczkę).

Analogiczną metodę stosowano w przypadku zwężenia dróg żółciowych. Cholangiografia ukazująca pobieranie wymazu szczoteczkowego ze zwężenia DŻ u pacjentki z guzem Klatskina jest przedstawiona na rycinie 2.



**Rycina 2.** Endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna (ECPW): cholangiografia ukazująca pobieranie wymazu szczoteczki ze zwężenia DŻ u pacjentki z guzem Klatskina (strzałka wskazuje szczoteczkę).

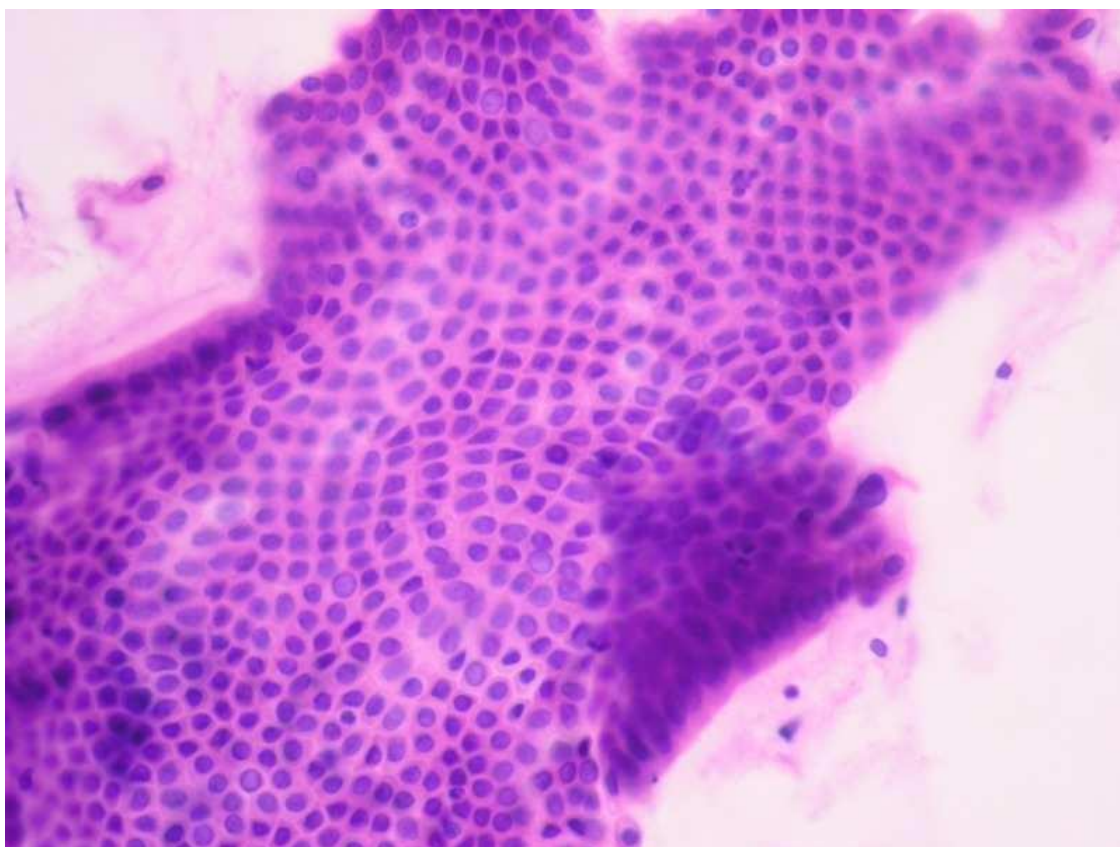
Poszerzanie zwężenia przed wymazem szczoteczki wykonano u 40/151 pacjentów (26,49%) – 21/64 (32,81%) ze zwężeniem PT i 19/87 (21,84%) ze zwężeniem DŻ. Przewód trzustkowy i/lub drogi żółciowe protezowano u 138/151 chorych (91,39%). Stenty trzustkowe wprowadzono u 53/151 pacjentów (35,1%), a żółciowe u 94/151 (62,25%). Powikłania po ECPW obserwowano u 10/151 pacjentów (6,6%) – 3/64 ze zwężeniem PT (4,7%) i 7/87 ze zwężeniem DŻ (8,05%). Powikłania klasyfikowano według kryteriów opisanych przez Cottona i wsp.[77] W przypadku wymazów z PT było to jedno powikłanie o umiarkowanym stopniu ciężkości (posocznica bez wstrząsu septycznego) i dwa poważne (krwawienie wymagające przetoczenia  $\geq 5$  opakowań koncentratu krwinek czerwonych oraz ciężki ostry rzut zapalenia trzustki zakończony zgonem). U chorych po wymazach z DŻ wystąpiły dwa powikłania łagodne (gorączka  $>38^{\circ}\text{C}$ ) oraz 5 o umiarkowanym stopniu ciężkości

(u 3 ropne zapalenie dróg żółciowych, a u 2 ropień wątroby wymagający drenażu przezskórnego).

Wykonywano dwa osobne wymazy na badanie cytologiczne i na FISH. Szczoteczkę przesuwano 5 razy w miejscu zwężenia, a następnie chowano ją do cewnika w celu ochrony przed utratą pobranego materiału podczas wyjmowania szczoteczki z endoskopu. Niezwłocznie wykonywano rozmazy na szkiełkach laboratoryjnych. Przygotowywano 4 preparaty na badanie cytologiczne i 2 na FISH. Preparaty przeznaczone do oceny cytologicznej były utrwalane w 70% roztworze alkoholu etylowego, aby zapobiec ich wysychaniu, natomiast przeznaczone do FISH pozostawiano do wyschnięcia na powietrzu.

### **3.2.1 Cytologia**

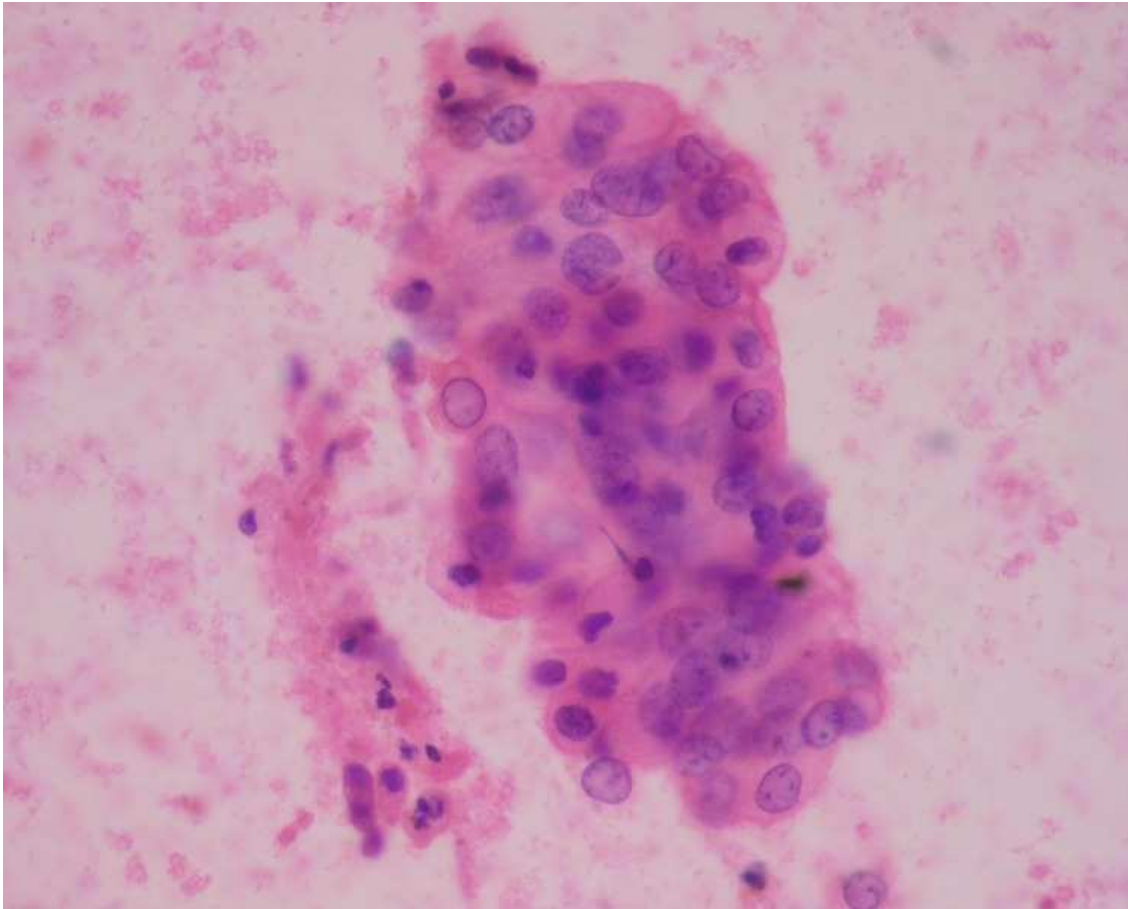
Preparaty do oceny cytologicznej przekazywano do Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Tam były barwione metodą hematoksylina-eozyna, a następnie oceniane przez doświadczonych patologów. Wymazy oceniano jako złośliwe, atypowe lub łagodne. Cytologiczne rozpoznanie łagodnego zwężenia stawiano wówczas, gdy w preparacie stwierdzano komórki monomorficzne, o niskim stosunku jądrocytoplazmatycznym, o małych, regularnych jądrach, rozmieszczone głównie w płaskich płatach przypominających plastry miodu (rycina 3).



**Rycina 3.** Przykładowy obraz cytologii wymazu szczoteczkowego – rozpoznanie łagodnego zwężenia.

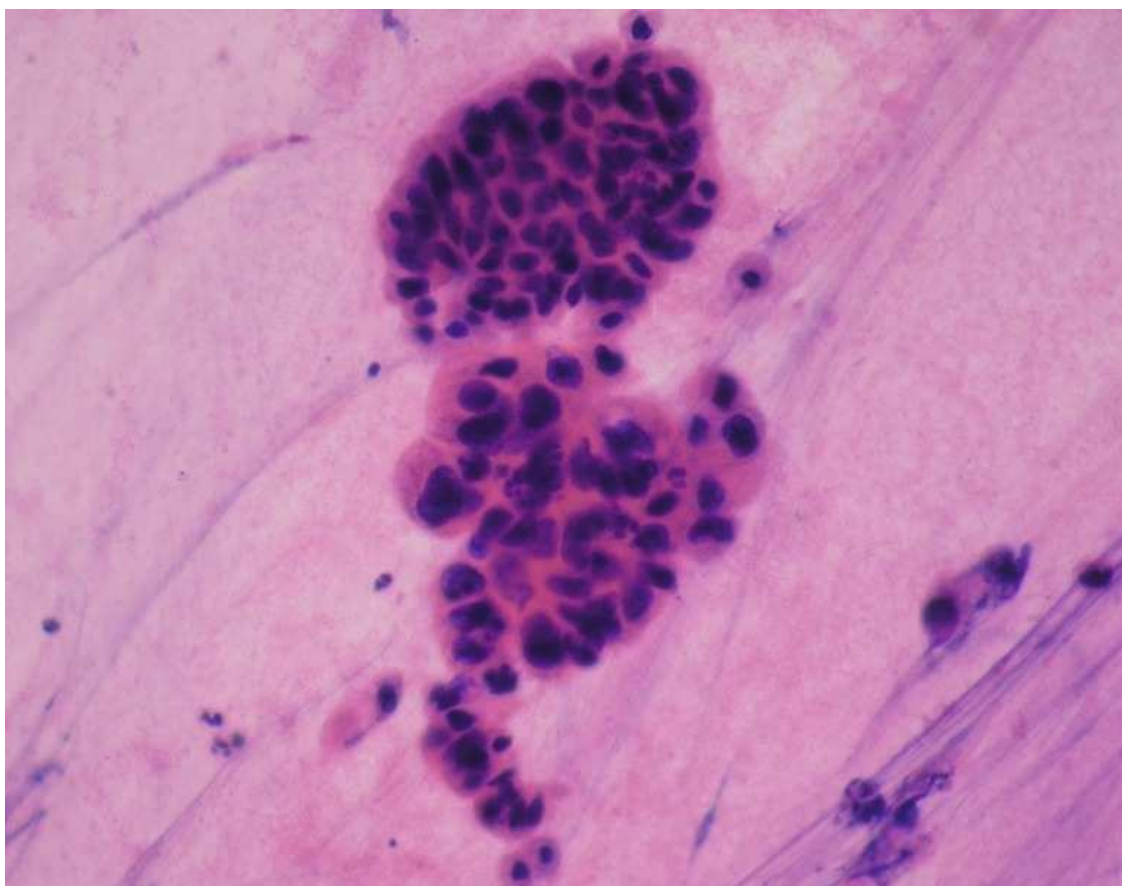
Atypię rozpoznawano, gdy komórki były większe niż prawidłowe, o wyższym stosunku jądrowo-cytoplazmatycznym, o nieznacznie nieregularnych jądrach, z nieco zagęszczoną chromatyną, z jedynie miejscowo słabo widocznymi jąderkami, rozmieszczone głównie w płatach i grupach, jednak nie tak regularnych jak w przypadkach łagodnych, niekiedy nakładające się na siebie, chociaż nie modelujące się wzajemnie (rycina 4).





**Rycina 4.** Przykładowy obraz cytologii wymazu szczoteczkiowego – rozpoznanie atypii.

W przypadkach rozpoznania złośliwych zmian obserwowano komórki znacznie różniące się od siebie (pleomorficzne), o wysokim indeksie jądrocytoplazmatycznym, o nieregularnych jądrach, hiperchromatyczne, z widocznymi figurami podziału, w tym figurami atypowymi, tworzące gniazda – tj. układy trójwymiarowe, nakładające się na siebie i modelujące się wzajemnie, a miejscami rozsypujące się (rycina 5).



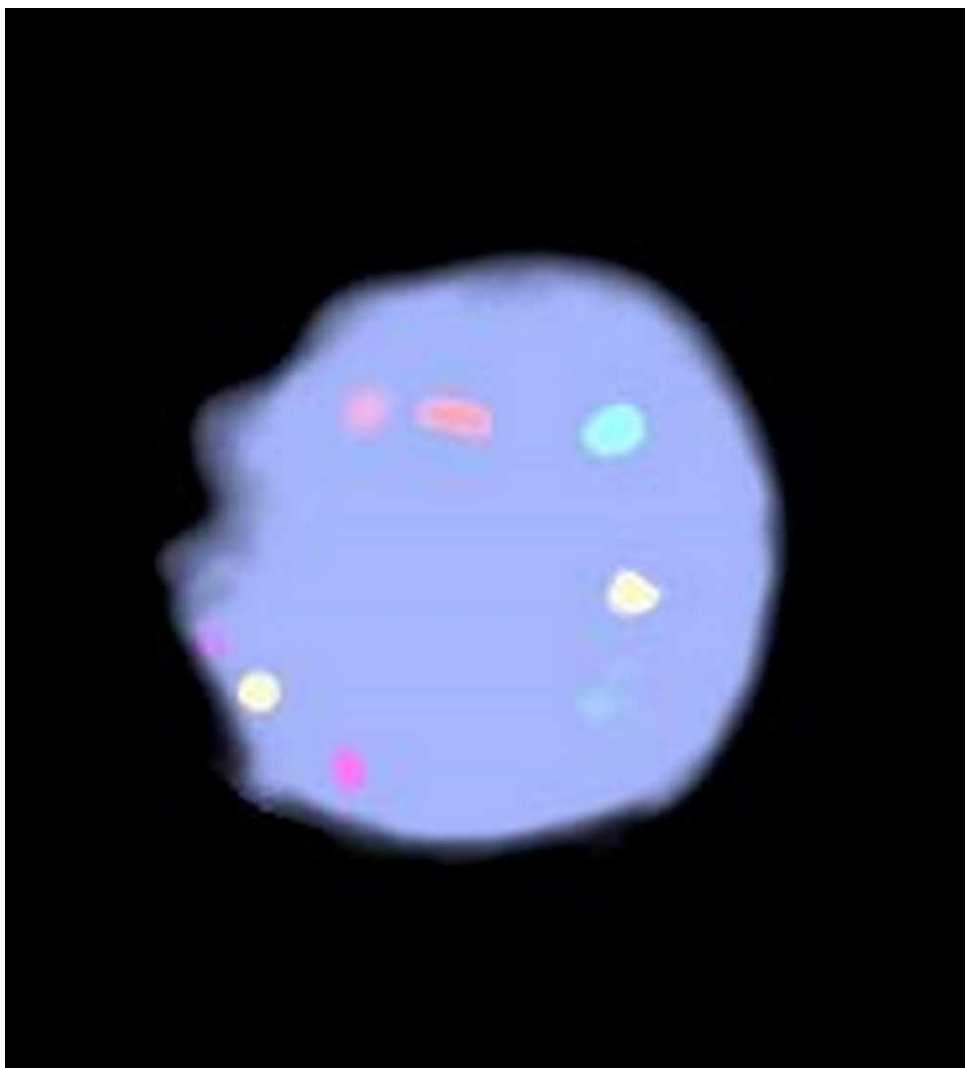
**Rycina 5.** Przykładowy obraz cytologii wymazu szczoteczkowego – rozpoznanie złośliwego zwężenia.

Wyniki cytologii interpretowano na dwa sposoby. Najpierw za wynik dodatni uznawano cytologiczne rozpoznanie złośliwego charakteru zwężenia, podczas gdy rozpoznania łagodne i atypia były klasyfikowane jako wynik ujemny. Następnie przeprowadzano ponowną analizę statystyczną uznając za wynik dodatni cytologiczne rozpoznanie atypii i zmian złośliwych, a za wynik ujemny tylko rozpoznania łagodne. W ten sposób próbowano ocenić, jaki jest wpływ zakwalifikowania atypii do wyników dodatnich lub ujemnych na czułość, swoistość, wartość predykcyjną wyniku dodatniego i wartość predykcyjną wyniku ujemnego cytologii wymazów szczoteczkowych.

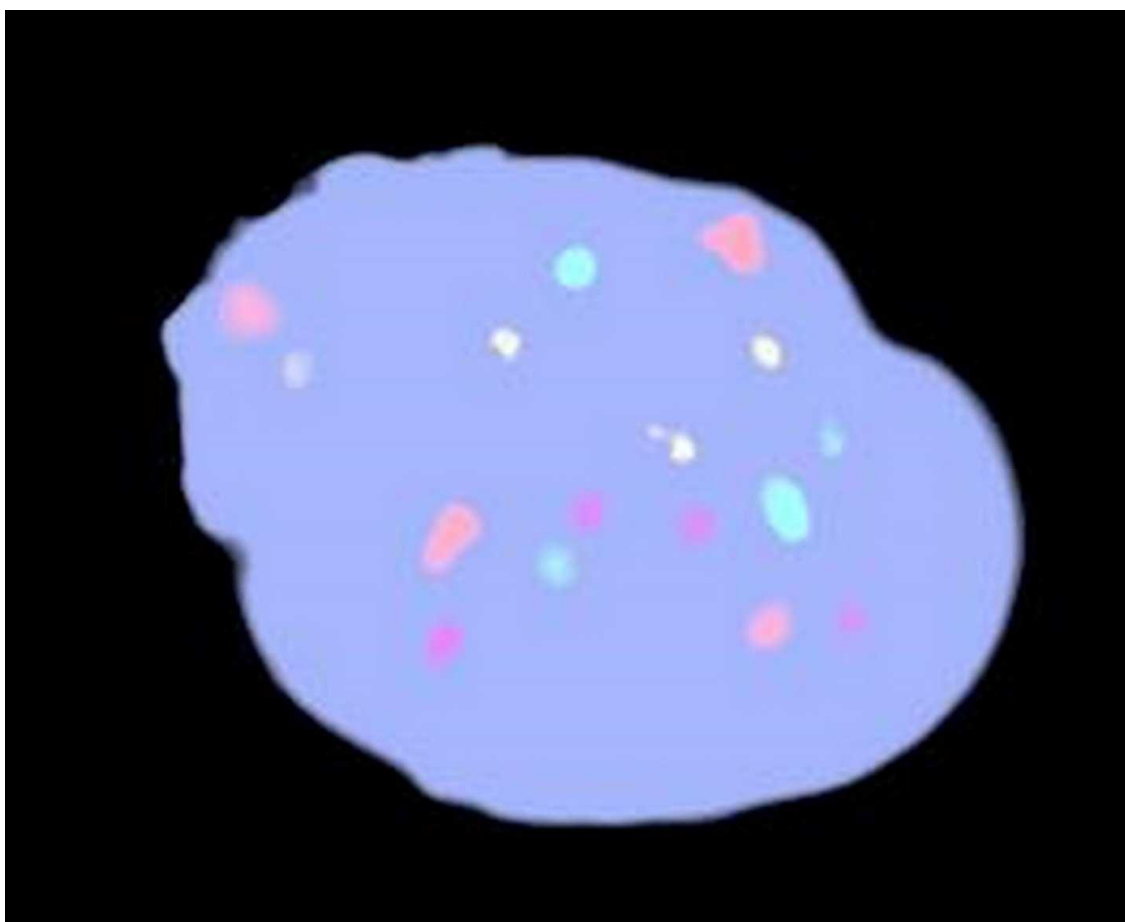
### 3.2.2 Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Preparaty do badania techniką FISH przekazywano do Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. FISH wykonywano za pomocą zestawu UroVysion (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) wykrywającego aneuploidię 3, 7 i 17 chromosomu oraz delecję w locus 9p21. Jest to zestaw używany do wykrywania aberracji chromosomalnych w preparatach osadu moczu pacjentów z podejrzeniem raka pęcherza moczowego.[72,73] Zestaw składa się z czterech sond DNA znakowanych fluoroforami. Trzy z nich łączą się z centromerami chromosomów 3, 7 i 17 (CEP – *Chromosome Enumeration Probe*), a jedna jest sondą unikalną dla locus 9p21 (LSI – *Locus Specific Identifier*), która łączy się z genem p16 w locus 9p21. Sondy te występują w czterech kolorach: czerwonym (CEP 3 SpectrumRed), zielonym (CEP 7 SpectrumGreen), jasnoniebieskim (CEP 17 SpectrumAqua) i żółtym (LSI 9p21 SpectrumGold). Analizę aberracji chromosomalnych przy użyciu testu UroVysion wykonuje się w jądrach interfazowych komórek. Najpierw DNA było denaturowane do form jednoniciowych, a następnie poddawane hybrydyzacji ze znakowanymi sondami. Po zakończeniu hybrydyzacji wypłukiwano niezwiązane sondy, a następnie barwiono jądra komórkowe barwnikiem DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol), który wiąże się specyficznie z DNA i fluoryzuje na niebiesko. Dokładny protokół metody FISH opracowany dla potrzeb tego badania znajduje się w załącznikach. Uzyskane w ten sposób preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji. Sygnały pochodzące z sond molekularnych widoczne w poszczególnych jądrach komórkowych były zliczane przez doświadczonego cytogenetyka, który nie znał rozpoznań cytologicznych. W wątpliwych przypadkach preparaty były weryfikowane przez drugą wykwalifikowaną osobę. Wynik był uznawany za dodatni jeśli w co najmniej 5 komórkach obserwowano polisomię któregośkolwiek chromosomu albo trisomię chromosomu 3 lub 7. Liczba ocenianych jąder komórkowych wahała się od 20 w przypadku wyników

ewidentnie dodatnich do 80 w przypadku wyników ujemnych. Zdjęcia przedstawiające przykładowe wyniki FISH są widoczne na rycinach 6 i 7.



**Rycina 6.** Przykładowy obraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* materiału z wymazów szczoteczkowych - prawidłowa komórka diploidalna (disomia – widoczne 2 sygnały każdej sondy).



**Rycina 7.** Przykładowy obraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* materiału z wymazów szczoteczkowych - polisomia (widoczne 4 sygnały każdej sondy).

### 3.2.3 Analiza statystyczna

Czułość, swoistość, wartość predykcyjną wyniku dodatniego (WPWD) i wartość predykcyjną wyniku ujemnego (WPWU) obliczono z 95% przedziałem ufności Wilsona. Czułość to stosunek wyników prawdziwie dodatnich do sumy wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych. Swoistość to stosunek wyników prawdziwie ujemnych do sumy wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich. Wartość predykcyjna wyniku dodatniego to stosunek wyników prawdziwie dodatnich do sumy wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie dodatnich. Natomiast wartość predykcyjna wyniku ujemnego to stosunek

wyników prawdziwie ujemnych do sumy wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie ujemnych. Wartości te obliczono zarówno dla cytologii, jak i FISH z wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego i dróg żółciowych łącznie oraz osobno dla PT i DŻ. Do porównania uzyskanych wartości użyto testu  $\chi^2$  oraz dokładnego testu Fishera. Różnice w częstościach uznawano za znamienne statystycznie, gdy wartość poziomu istotności p była poniżej 0,05.

## 5. WYNIKI

Sok trzustkowy pobrano u 8 pacjentów ze zwężeniem przewodu trzustkowego. Charakter zwężenia u 6 pacjentów był łagodny, a u 2 chorych nowotworowy (rak trzustki i rak brodawki Vater). Wyniki cytologii we wszystkich przypadkach były ujemne. Ze względu na trudności w uzyskaniu odpowiednich objętości soku trzustkowego po przeprowadzeniu prób pilotażowych zrezygnowano z kontynuowania tej części badania. Liczebność grupy jest zbyt mała, aby przeprowadzić analizę statystyczną uzyskanych wyników.

Wymazy szczoteczkowe pobrano u 151 pacjentów. Przeprowadzono analizę wyników cytologii wymazów szczoteczkowych dla 148 pacjentów, a FISH dla 67 chorych. W przypadku cytologii uzyskano 33 wyniki dodatnie, 15 wyników atypowych i 100 ujemnych. Gdy atypię interpretowano jako wynik ujemny, wówczas stwierdzono 33 wyniki prawdziwie dodatnie (12 dla PT i 21 dla DŻ), 56 prawdziwie ujemnych (34 dla PT, 22 dla DŻ) i 59 fałszywie ujemnych (16 dla PT, 43 dla DŻ). Nie obserwowano wyników fałszywie dodatnich. Natomiast gdy atypia była uznawana za wynik dodatni, to stwierdzono 48 wyników prawdziwie dodatnich (15 dla PT i 33 dla DŻ), 56 prawdziwie ujemnych (34 dla PT, 22 dla DŻ) i 44 fałszywie ujemne (13 dla PT, 31 dla DŻ). Również w tym przypadku nie obserwowano wyników fałszywie dodatnich. W grupie FISH było 31 wyników dodatnich i 36 ujemnych. Odnotowano 28 wyników prawdziwie dodatnich (13 dla PT i 15 dla DŻ), 3 fałszywie dodatnie (2 dla PT i 1 dla DŻ), 21 prawdziwie ujemnych (12 dla PT i 9 dla DŻ) oraz 15 fałszywie ujemnych (4 dla PT i 11 dla DŻ). Wyliczono czułość, swoistość, wartość predykcyjną wyniku dodatniego (WPWD) i wartość predykcyjną wyniku ujemnego (WPWU) dla cytologii wymazów szczoteczkowych, gdy atypia była interpretowana jako wynik ujemny oraz ponownie interpretując atypię jako wynik dodatni. Następnie porównano uzyskane wyniki dla zwężeń PT i DŻ. Przeprowadzono także porównanie wyników cytologii, gdy atypia była interpretowana jako wynik ujemny z wartościami uzyskanymi dla atypii uznawanej za wynik dodatni. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4.** Czulość, swoistość, WPWD i WPWU cytologii, gdy atypia była interpretowana jako wynik ujemny oraz gdy atypia była uważana za wynik dodatni.

Zwężenie (n)	Czulość (95% CI)	Swoistość (95% CI)	WPWD (95% CI)	WPWU (95% CI)
<b>Atypia jako wynik ujemny</b>				
<b>PT + DŻ (148)</b>	35,87% (26,82-46,05)	100% (93,58-100)	100% (89,57-100)	48,7% (39,75-57,72)
<b>PT (62)</b>	42,86% (26,51-60,93)	100% (89,85-100)	100% (75,75-100)	68% (54,19-79,24)
<b>DŻ (86)</b>	32,81% (22,57-45)	100% (85,13-100)	100% (84,54-100)	33,85% (23,53-45,96)
<b>PT vs. DŻ</b>	$p = 0,244$	$p = 1,000$	$p = 1,000$	$p < 0,000$
<b>Atypia jako wynik dodatni</b>				
<b>PT + DŻ (148)</b>	52,17% (42,09-62,09)	100% (93,58-100)	100% (92,59-100)	56% (46,23-65,33)
<b>PT (62)</b>	53,57% (35,81-70,47)	100% (89,85-100)	100% (79,61-100)	72,34% (58,24-83,06)
<b>DŻ (86)</b>	51,56% (39,58-63,37)	100% (85,13-100)	100% (89,57-100)	41,51% (29,26-54,91)
<b>PT vs. DŻ</b>	$p = 0,520$	$p = 1,000$	$p = 1,000$	$p < 0,002$
<b>C atypia (-) vs. C atypia (+) (148)</b>	$p < 0,019$	$p = 1,000$	$p = 1,000$	$p = 0,176$

n – liczba pacjentów, PT – przewód trzustkowy, DŻ – drogi żółciowe, WPWD – wartość predykcyjna wyniku dodatniego, WPWU – wartość predykcyjna wyniku ujemnego, 95% CI – 95% przedział ufności, C – cytologia, atypia (-) – atypia interpretowana jako wynik ujemny, atypia (+) – atypia interpretowana jako wynik dodatni

Wartości czulości, swoistości, WPWD i WPWU FISH wymazów szczoteczkowych oraz porównanie wyników FISH dla zwężeń PT i DŻ



zaprezentowano w tabeli 5. Otrzymane wartości porównano z wynikami uzyskanymi dla cytologii (tabela 5).

**Tabela 5.** Czulość, swoistość, WPWD i WPWU fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

Zwężenie (n)	Czulość (95% CI)	Swoistość (95% CI)	WPWD (95% CI)	WPWU (95% CI)
<b>PT + DŻ (67)</b>	65,12% (50,17-77,58)	87,50% (69-95,66)	90,32% (75,1-96,65)	58,33% (42,2-72,86)
<b>PT (31)</b>	76,47% (52,74-90,44)	85,71% (60,06-95,99)	86,67% (62,12-96,26)	75% (50,5-89,82)
<b>DŻ (36)</b>	57,69% (38,95-74,46)	93,75% (71,67-99,68)	93,75% (71,67-99,68)	45% (25,82-65,79)
<b>PT vs. DŻ</b>	$p = 0,175$	$p = 0,629$	$p = 0,475$	$p = 0,069$
<b>C atypia (-) (148) vs. FISH (67)</b>	$p < 0,001$	$p < 0,025$	$p = 0,108$	$p = 0,207$
<b>C atypia (+) (148) vs. FISH (67)</b>	$p = 0,110$	$p < 0,025$	$p = 0,057$	$p = 0,483$

n – liczba pacjentów, PT – przewód trzustkowy, DŻ – drogi żółciowe, WPWD – wartość predykcyjna wyniku dodatniego, WPWU – wartość predykcyjna wyniku ujemnego, 95% CI – 95% przedział ufności, C – cytologia, atypia (-) – atypia interpretowana jako wynik ujemny, atypia (+) – atypia interpretowana jako wynik dodatni, FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Kolejne obliczenia wykonano dla grupy 64 pacjentów, u których uzyskano wyniki zarówno cytologii, jak i FISH. Obliczono czulość, swoistość, WPWD i WPWU gdy za wynik dodatni uznawano obecność przynajmniej jednej z następujących zmiennych: rozpoznania złośliwego w cytologii lub obecności cytologicznej atypii lub dodatniego wyniku FISH. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 6. Otrzymane wartości czulości, swoistości, WPWD i WPWU porównano z wartościami uzyskanymi dla cytologii i FISH (tabela 6).

**Tabela 6.** Czulość, swoistość, WPWD i WPWU, gdy za wynik dodatni uznawano rozpoznanie złośliwe w cytologii lub obecność atypii lub dodatnią FISH.

Zwężenie (n)	Czulość (95% CI)	Swoistość (95% CI)	WPWD (95% CI)	WPWU (95% CI)
<b>PT + DŻ (64)</b>	85.37% (71.56-93.12)	86.96% (67.87-95.46)	92.11% (79.2-97.3)	76.92% (57.9-89.0)
<b>PT (29)</b>	93.75% (71.67-98.89)	84.61% (57.76-95.67)	88.24% (65.7-96.7)	91.67% (64.6-99.6)
<b>DŻ (35)</b>	80% (60.87-91.14)	90% (59.58-98.21)	95.24% (77.3-99.8)	64.29% (38.8-83.6)
<b>PT vs. DŻ</b>	$p = 0,228$	$p = 0,602$	$p = 0,419$	$p = 0,117$
<b>C atypia(-) (148) vs. C atypia(+) lub FISH(64)</b>	$p < 0,000$	$p < 0,022$	$p = 0,148$	$p < 0,007$
<b>C atypia(+) (148) vs. C atypia(+) lub FISH(64)</b>	$p < 0,000$	$p < 0,022$	$p = 0,082$	$p < 0,041$
<b>FISH (67) vs. C atypia(+) lub FISH(64)</b>	$p < 0,028$	$p = 0,646$	$p = 0,561$	$p = 0,104$

n – liczba pacjentów, PT – przewód trzustkowy, DŻ – drogi żółciowe, WPWD – wartość predykcyjna wyniku dodatniego, WPWU – wartość predykcyjna wyniku ujemnego, 95% CI – 95% przedział ufności, C – cytologia, atypia (-) – atypia jako wynik ujemny, atypia (+) – atypia jako wynik dodatni, FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Gdy za wynik dodatni cytologii uznawałam tylko cytologiczne rozpoznania zmian złośliwych, czułość metody dla zwężeń PT i DŻ była niska i wyniosła 35,87% przy swoistości 100%, WPWD 100%, a WPWU 48,7%. Porównując wartości obliczanych parametrów dla PT i DŻ stwierdziłam wyższą czułość i WPWU cytologii w przypadku zwężeń PT (odpowiednio 42,86% vs. 32,81% i 68% vs. 33,85%) przy swoistości i WPWD 100% dla obu typów zwężeń. Statystyczną znamienność obserwowałam tylko dla różnicy pomiędzy wartościami WPWU ( $p < 0,000$ ).

Czułość cytologii wzrosła, gdy jako wynik dodatni interpretowałam także obecność atypii i wyniosła 52,17% dla całej grupy, 53,57% dla PT i 51,56% dla DŻ. Różnica ta była istotna statystycznie (52,17% vs. 35,87%,  $p < 0,019$ ). Poprawiła się także WPWU, która wzrosła do 56% dla całej grupy, 72,34% dla PT i 41,51% dla DŻ, jednak różnica nie była statystycznie znamienna (56% vs. 48,7%,  $p = 0,176$ ). Nie wpłynęło to na wyniki swoistości i WPWD, które pozostały na poziomie 100%. Różnice pomiędzy wynikami dla PT i DŻ były znamienne statystycznie także tylko dla WPWU ( $p < 0,002$ ).

Czułość FISH była wyższa niż cytologii zarówno w przypadku interpretacji atypii jako wyniku ujemnego, jak i atypii jako wyniku dodatniego (odpowiednio 65,12% vs. 35,87% i 65,12% vs. 52,17%), jednak statystycznie znamiennej różnicy stwierdziłam tylko w pierwszym przypadku ( $p < 0,001$ ). Natomiast swoistość FISH była niższa niż cytologii i wyniosła 87,5% w porównaniu do 100%, a różnica była istotna statystycznie ( $p < 0,025$ ). WPWD była niższa dla FISH niż dla cytologii (90,32% vs. 100%), a WPWU wyższa (58,33% vs. 48,7% dla atypii jako wyniku ujemnego i 56% dla atypii jako wyniku dodatniego), jednak nie stwierdziłam znamienności statystycznej dla tych różnic. Czułość i WPWU FISH były wyższe dla wymazów z PT w porównaniu do DŻ (odpowiednio 76,47% vs. 57,69% i 75% vs. 45%), a swoistość i WPWD niższe dla PT (odpowiednio

85,71% vs. 93,75% i 86,67% vs. 93,75%), różnice nie były jednak istotne statystycznie.

Gdy za wynik dodatni uznawałam obecność jednej z następujących zmiennych: rozpoznania złośliwego w cytologii lub obecności atypii lub dodatniej FISH, wówczas czułość badania była najwyższa i wynosiła 85,37% dla całej grupy, 93,75% dla PT i 80% dla DŻ. Znamienność statystyczną obserwowałam zarówno dla różnicy pomiędzy czułością w tej grupie a cytologią (85,37% vs. 35,87%,  $p < 0,000$  dla atypii jako wyniku ujemnego i 85,37% vs. 52,17%,  $p < 0,000$  dla atypii jako wyniku dodatniego), jak i FISH (85,37% vs. 65,12%,  $p < 0,028$ ). Swoistość w tej grupie była istotnie niższa niż dla cytologii (86,96% vs. 100%,  $p < 0,022$ ), natomiast w porównaniu z FISH nie obserwowałam statystycznie znamiennej różnicy (86,96% vs. 87,5%,  $p = 0,646$ ). WPWD była w tej grupie niższa niż w grupie cytologii (92,11% vs. 100%) i wyższa niż w grupie FISH (92,11% vs. 90,32%), a WPWU była wyższa w porównaniu do cytologii i FISH (76,92% vs. odpowiednio 48,7% i 58,33%), jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Porównując wymazy z PT i DŻ w tej grupie obserwowałam wyższą czułość i WPWU dla PT (odpowiednio 93,75% vs. 80% i 91,67% vs. 64,29%) oraz niższą swoistość i WPWD (odpowiednio 84,61% vs. 90% i 88,24% vs. 95,24%). Nie stwierdziłam znamienności statystycznej dla tych różnic.

## 6. Dyskusja

Rola cytologii soku trzustkowego w diagnostyce złośliwych zwężeń przewodu trzustkowego głównego (PT) w mojej pracy okazała się bardzo ograniczona. Pobieranie soku trzustkowego odbywało się bez wcześniejszej stymulacji wydzielania sekretyną podawaną dożylnie. Mimo licznych prób odpowiednią objętość soku do wykonania badania cytologicznego udało się pobrać zaledwie u 8 chorych. Wynika to z utrudnionego odpływu soku trzustkowego u pacjentów ze zwężeniami PT. Podobną do stosowanej w moim badaniu metodę pobierania soku trzustkowego w przypadku zwężeń PT bez stymulacji sekretyną wykorzystali w swojej pracy Pugliese i wsp.[46] Uzyskali sok trzustkowy u 29 spośród 66 badanych pacjentów. Pobrane próbki soku trzustkowego były niezadowolające w 21% przypadków (6/29). Czulość cytologii soku trzustkowego w ich badaniu wyniosła 58%, swoistość 100%, WPWD 100%, a WPWU 33%. Autorzy tej pracy stwierdzili, że cytologia wymazów szczoteczkowych z PT charakteryzuje się wyższą czulością, niż cytologia soku trzustkowego oraz że pobranie soku trzustkowego na badanie cytologiczne u pacjentów, u których wykonano także wymaz szczoteczkowy, nie wpływa istotnie na poprawę czulości cytologii, wydłuża natomiast czas trwania procedury o ok. 10 min. Wyższą czulość cytologii soku trzustkowego w wykrywaniu wczesnego raka trzustki opisali w swoim doniesieniu Nakaizumi i wsp.[47] W ich pracy czulość metody wyliczono na 67%, swoistość na 100%, WPWD na 100%, a WPWU na 98%. Uzyskali oni sok trzustkowy po dożylniej stymulacji sekretyną u 61 chorych. Byli to pacjenci z objawami sugerującymi chorobę trzustki, jednak bez zwężenia PT. Według autorów w przypadku chorych z małym guzem trzustki bez zwężenia PT bardziej inwazyjna procedura pobierania soku trzustkowego po stymulacji sekretyną nie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań po ECPW. Zastosowanie w moim badaniu dożylnych preparatów sekretyny prawdopodobnie zwiększyłoby objętość uzyskiwanego soku, jednak wpłynęłoby na wydłużenie czasu ECPW i wzrost kosztów, a w przypadku ciasnych zwężeń PT mogłoby również przyczynić się

do większej liczby powikłań po zabiegu ze względu na wzrost ciśnienia w PT powyżej miejsca zwężenia.[46,47,67] Ograniczenia cytologii soku trzustkowego u pacjentów ze zwężeniami PT, przy braku korzyści z zastosowania tej metody diagnostycznej u chorych, u których pobrano wymaz szczoteczkowy ze zwężenia PT, prowadzą do wyjątkowo rzadkiego wykorzystywania tego badania w praktyce klinicznej.

Czułość rutynowej cytologii uzyskana w moim badaniu była niska i wyniosła 35,87% dla całej grupy, 42,86% dla PT i 32,81% dla DŻ, natomiast swoistość była bardzo wysoka, gdyż wyniosła 100% dla wszystkich grup. Według wcześniejszych doniesień czułość cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ mieści się w szerokim zakresie wartości - 33,3-81,8% dla PT i 15-60% dla DŻ, przy wysokiej swoistości sięgającej 97-100% dla PT i 90-100% dla DŻ.[1,48,51-55,78] W związku z tym otrzymane przeze mnie wartości nie odbiegają od wyników uzyskanych przez innych badaczy i potwierdzają wysoką swoistość wymazów szczoteczkowych w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń PT i/lub DŻ. Równie wysokie wartości jak w przypadku swoistości uzyskałam dla WPWD (100% we wszystkich grupach), co koresponduje z wynikami innych autorów (89%-100%).[1,48,51-55,78] W moim badaniu nie było wyników fałszywie dodatnich, co wskazuje na dużą wiarygodność wymazów szczoteczkowych w wykrywaniu nowotworowych zwężeń PT i/lub DŻ w przypadku uzyskania dodatniego wyniku cytologii. WPWU cytologii wymazów szczoteczkowych z DŻ była niska (33,85%), więc ujemny wynik cytologii nie przesądza o łagodnym charakterze zwężenia DŻ. Natomiast w przypadku zwężeń PT WPWU była istotnie wyższa niż dla DŻ (68% vs. 33,85%,  $p < 0,000$ ), w związku z tym wyższa jest też wiarygodność wyniku ujemnego cytologii z PT.

Zasadniczym ograniczeniem cytologii wymazów szczoteczkowych z PT i DŻ jest niska czułość, dlatego należy dążyć do jej poprawy. Podejmowane są próby zwiększenia czułości tej swoistej metody diagnostycznej poprzez zmniejszenie odsetka wyników fałszywie ujemnych[5,52,53,55,78] oraz zastosowanie

dotatkowych zaawansowanych technik cytologicznych, takich jak stwierdzenie obecności mutacji genu K-ras[46,56-60] i p53,[61-64] zwiększonej aktywności telomerazy[66,67] lub aneuploidii (przy użyciu FISH)[51,68,69] w materiale uzyskanym za pomocą wymazów szczoteczkowych.

Najczęstszą przyczyną wyników fałszywie ujemnych cytologii wymazów szczoteczkowych jest błąd związany z pobieraniem wymazu (60-80% przypadków).[53,61] Możemy wyróżnić dwie przyczyny powstawania błędów tego typu. Po pierwsze, w niektórych przypadkach zostaje pobrana niewystarczająca ilość materiału, co skutkuje wykonaniem preparatów ubogokomórkowych i uniemożliwia prawidłową analizę cytologiczną. W moim badaniu preparaty ubogokomórkowe uzyskałam u 21/148 pacjentów (14%). Ten rodzaj błędu można ograniczyć dzięki bezpośredniej ocenie preparatu przez patologa obecnego podczas badania endoskopowego i powtórzeniu wymazu w razie uzyskania niezadowalającej ilości materiału.[61] Inną metodą zwiększenia ilości pobranego materiału jest wyplukanie szczoteczki w odpowiednim roztworze utrwalającym komórki po wykonaniu rozmazu i odwirowanie uzyskanych popłuczyn w celu uzyskania dodatkowych preparatów[46,61] lub rezygnacja z wykonywania bezpośrednich rozmazów na rzecz wyplukiwania materiału ze szczoteczki i wykonywania preparatów do oceny cytologicznej wyłącznie z odwirowanego płynu.[51,68,69] W przypadku podejrzenia raka trzustki i zwężenia obu przewodów (PT i DŻ), poprawę czułości można osiągnąć poprzez jednoczesne wykonanie wymazów szczoteczkowych z PT i DŻ.[79] Po drugie, pobrany materiał może nie zawierać komórek nowotworowych mimo złośliwego charakteru zwężenia. Dzieje się tak w przypadku podśluzówkowego szerzenia się nowotworu, gdy miejsce zwężenia pokryte jest prawidłowym nabłonkiem, zwężenia złośliwego spowodowanego uciskiem nowotworu z zewnątrz lub pobrania materiału zawierającego głównie tkanki martwicze guza.[5,53,61,78] Jeśli obraz cholangiopankreatograficzny sugeruje złośliwy charakter zwężenia PT i/lub DŻ, a wynik cytologii jest ujemny, wówczas należy rozważyć powtórzenie wymazu. Elek i wsp.[61] odnotowali

wzrost czułości o 8% dzięki wykonaniu powtórnego wymazu u takich chorych. U pacjentów u których uzyskano 3 ujemne wyniki cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń DŻ, ryzyko złośliwej etiologii zwężenia jest mniejsze niż 6%.[53,61]

Drugim rodzajem błędu wpływającym na czułość cytologii jest błąd techniczny związany z nieprawidłowym przygotowaniem preparatu i dotyczy on 10-20% wyników fałszywie ujemnych.[61] Ocena cytologiczna jest bardzo utrudniona w przypadku wysuszenia preparatu, stąd kluczowe jest utrwalenie preparatu w alkoholu niezwłocznie po wykonaniu rozmazu.[53,61] Niewystarczające wybarwienie jąder może z kolei utrudnić ocenę chromatyny i wykrycie komórek nowotworowych.[61] Aby poprawić czułość cytologii, należy dążyć do optymalnego przygotowania preparatów przez pracowników laboratorium cytologicznego lub odpowiednio przeszkolony personel pracowni endoskopowej.[53] W moim badaniu wysuszenie preparatów utrudniające interpretację cytologiczną odnotowano w 3 przypadkach (3/148, 2%).

Trzecią przyczyną wyników fałszywie ujemnych jest błąd interpretacyjny na etapie oceny cytologicznej uzyskanych preparatów polegający na nierozpoznanie komórek nowotworowych w analizowanym materiale.[5,53,61] Dotyczy on około 8-17% wyników fałszywie ujemnych.[61] Trudności w postawieniu prawidłowego rozpoznania cytologicznego mogą pojawić się w przypadku nowotworów dobrze zróżnicowanych oraz w przypadku guzów brodawkowatych i śluzowych.[5,61,78] Poważnym błędem interpretacyjnym jest lekceważenie błędu technicznego i próba postawienia pewnego rozpoznania na podstawie preparatów złej jakości.[61] W moim badaniu nie przeprowadzono ponownej weryfikacji postawionych rozpoznań cytologicznych, w związku z tym nie oceniłam częstości występowania błędów interpretacyjnych.

Osobny problem diagnostyczny stanowi interpretacja niejednoznacznych preparatów cytologicznych. W niektórych doniesieniach stawiano tylko dwa rozpoznania cytologiczne – łagodne i złośliwe,[46,79] podczas gdy w innych



pojawiają się dodatkowe odrębne kategorie rozpoznań takie jak atypia lub dysplazja, czy też zmiany „podejrzane” o złośliwość.[6,52,55,61,78] W sytuacji wyodrębnienia jednej lub dwóch dodatkowych cytologicznych kategorii diagnostycznych, zakwalifikowanie ich do wyników dodatnich lub ujemnych może mieć istotny wpływ na czułość i swoistość metody. Częstość występowania atypii w wymazach szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ wynosi 10-30%.[61] W mojej pracy atypia była osobnym rozpoznaniem cytologicznym stwierdzanym u 15/148 pacjentów (10,14%). Gdy uznawałam atypię za wynik dodatni wymazu, wówczas czułość rutynowej cytologii wzrosła i była to różnica znamienna statystycznie (35,87% vs. 52,17%,  $p < 0,019$ ). Taka analiza wyników nie wpłynęła natomiast na swoistość metody, która w przypadku obu interpretacji atypii wyniosła 100%, ponieważ nie stwierdzano wyników fałszywie dodatnich. Ta obserwacja sugeruje, że rozpoznanie cytologicznej atypii w wymazach szczoteczkowych ze zwężeń PT i/lub DŻ powinno budzić duże podejrzenie procesu złośliwego toczącego się u podłoża zwężenia. Podobne wnioski ze swoich prac wyciągali także inni badacze.[6,52,61] W związku z tym stwierdzenie atypii w wymazach szczoteczkowych z PT i/lub DŻ powinno skłaniać klinicystów do bardziej intensywnej diagnostyki w celu poszukiwania nowotworu.

We wspomnianej już pracy Pugliese i wsp.[46] ocenili rolę cytologii soku trzustkowego i wymazów szczoteczkowych z PT oraz obecności mutacji genu K-ras w materiale uzyskanym z soku trzustkowego lub wymazów szczoteczkowych w różnicowaniu przewlekłego zapalenia trzustki i raka trzustki. Do badania zakwalifikowali 47 pacjentów z guzem trzustki wykrytym w badaniach obrazowych (USG lub TK) lub nieprawidłową pankreatografią stwierdzaną w ECPW. Cytologia soku trzustkowego cechowała się czułością 58%, swoistością 100%, WPWD 100% i WPWU 33%. W przypadku wymazów szczoteczkowych było to odpowiednio 59%, 100%, 100% i 10%. Czułość cytologii wymazów szczoteczkowych udało się podnieść do 74% poprzez zastosowanie tzw. cytologii „oszczędzającej” (salvage cytology) polegającej na

badaniu cytologicznym płynu uzyskanego dzięki płukaniu szczoteczki po wykonaniu bezpośredniego rozmazu. Obecność mutacji genu K-ras pozwoliła na wykrycie raka trzustki z czułością i WPWD 87%, przy dość niskiej swoistości i WPWU 60%. Autorzy uznali, że cytologia wymazów szczoteczkowych (szczególnie przy zastosowaniu cytologii „oszczędzającej”) jest przydatna w rozpoznawaniu raka trzustki. Badanie cytologii soku trzustkowego powinno być ograniczone do pacjentów z podejrzeniem małego guza trzustki, ale bez zwężenia PT. Natomiast według autorów tego doniesienia obecność mutacji genu K-ras nie poprawia wartości diagnostycznej cytologii.

Stewart i wsp.[5] przeanalizowali wyniki cytologii 406 wymazów szczoteczkowych pobranych ze zwężeń PT lub DŻ. Czułość metody w tym doniesieniu wyniosła 59,8%, swoistość 98,1%, WPWD 98%, a WPWU 61,3%. Odnotowali oni 3 wyniki fałszywie dodatnie, które po ponownej analizie uznane zostały za atypowe. Atypię, podobnie jak w moim badaniu, obserwowano w 10,1% preparatów. Ostatecznie u 2/3 pacjentów z cytologicznym rozpoznaniem atypii stwierdzono nowotwór. Czułość cytologii wzrosła z 44,3% w grupie pacjentów, których wyniki oceniano w pierwszym okresie badania (ok. 1/3 chorych) do 70,7% w ostatniej trzeciej grupie chorych. Autorzy wiążą ten fakt głównie z nabywaniem doświadczenia przez patologa analizującego rozmazy, ale może to również wynikać z poprawy techniki pobierania materiału przez osoby wykonujące wymazy.

Logorno i wsp.[53] ocenili częstość i przyczyny występowania wyników fałszywie ujemnych 183 wymazów szczoteczkowych (159 z DŻ i 24 z PT) wykonanych w dwóch szpitalach uniwersyteckich. W ich badaniu czułość cytologii wyniosła 48%, swoistość 98%, WPWD 92%, a WPWU 76%. Zasadniczą przyczyną wyników fałszywie ujemnych było nieprawidłowe pobranie materiału (67%). Błędy interpretacyjne i błędy techniczne występowały w 17% wyników fałszywie ujemnych. Autorzy wskazują, że próby poprawy czułości cytologii wymazów szczoteczkowych powinny polegać na zminimalizowaniu częstości występowania wyników fałszywie ujemnych

poprzez wykonywanie dodatkowych wymazów w wątpliwych przypadkach, unikanie błędów technicznych i współpracę z doświadczonymi patologami.

Elek i wsp.[61] przeanalizowali wyniki cytologii 103 wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ. Czułość metody wyniosła 39%, swoistość i WPWD 100%, a WPWU 25%. Ponowna retrospektywna ocena preparatów przyczyniła się do wzrostu czułości cytologii do 53%. Porównali oni otrzymane wartości z wynikami biopsji wewnątrzprzewodowej, która charakteryzowała się niższą czułością (28%), ale wyższą WPWU (36%) w stosunku do cytologii. Najlepszy efekt uzyskano łącząc obie metody pobierania materiału ze zwężeń PT i/lub DŻ. Gdy za wynik dodatni uznano obecność komórek nowotworowych w cytologii lub biopsji, wówczas czułość wzrosła do 70%. Autorzy uznali obie techniki za uzupełniające się i sugerują ich łączenie w celu poprawy diagnostyki. Ocenili także przyczyny wyników fałszywie ujemnych. W badanej populacji błąd pobierania materiału stanowił 84% przyczyn wyników fałszywie ujemnych, błąd techniczny 4%, a interpretacyjny 12%. Autorzy uważają, że do zwiększenia czułości cytologii wymazów szczoteczkowych może się przyczynić opracowanie ścisłych kryteriów rozpoznania cytologicznych oraz poprawa jakości uzyskiwanych preparatów.

Czułość FISH w badanej przez mnie populacji była znamiennej wyższa niż czułość rutynowej cytologii (65,12% vs. 35,87%,  $p < 0,001$ ). Badanie to potwierdziło opisywaną wcześniej wyższą czułość FISH w porównaniu do cytologii w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń DŻ (57,69% vs. 32,81%).[6,51,68] Jest to pierwsze badanie oceniające rolę FISH w diagnostyce złośliwych zwężeń PT, które udowodniło, że FISH może być wykonywana na preparatach uzyskanych z wymazów szczoteczkowych zwężeń PT. W tej grupie pacjentów czułość FISH była także wyższa niż czułość cytologii (76,47% vs. 42,86%). FISH charakteryzowała się też wyższą czułością w porównaniu do cytologii, gdy interpretowano atypię jako wynik dodatni (65,12% vs. 52,17%), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Dewald i wsp.[71] ocenili za pomocą FISH, że częstość występowania zaburzeń chromosomalnych w preparatach tkankowych

uzyskanych z guzów nowotworowych trzustki wynosiła 80%. Podobne rozpowszechnienie aberracji chromosomalnych opisywano w przypadku raka dróg żółciowych.[70] Stanowi to potencjalne ograniczenie czułości techniki FISH w diagnostyce złośliwych zwężeń PT i/lub DŻ. Mimo to, metoda ta wyraźnie poprawia czułość konwencjonalnej cytologii. Charakteryzuje się wysoką czułością analityczną, przez co można nią wykryć nawet niewielką ilość komórek nowotworowych, gdy nie są one jeszcze stwierdzane innymi metodami.[68] Dlatego też konieczna jest długoterminowa obserwacja pacjentów z fałszywie dodatnimi wynikami FISH pod kątem rozwoju nowotworu, aby ostatecznie stwierdzić, czy wyniki te są faktycznie fałszywie dodatnie, czy też są bardzo wczesną manifestacją procesu rozrostowego niewykrywalnego innymi metodami.

WPWU FISH była także wyższa niż cytologii, jednak różnica nie była statystycznie znamienna. Gdy natomiast atypię interpretowano jako wynik dodatni, to różnica pomiędzy WPWU FISH i cytologii była bardzo niewielka (58,33% vs. 56%). Z kolei rutynowa cytologia cechowała się znamienne wyższą swoistością niż FISH zarówno, gdy atypię uznawano za wynik ujemny, jak i gdy interpretowano ją jako wynik dodatni (100% vs. 87,5%,  $p < 0,025$ ). Również WPWD była niższa w przypadku FISH niż w przypadku cytologii (90,32% vs. 100%), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Niższa swoistość i WPWD FISH wynika z wystąpienia trzech wyników fałszywie dodatnich FISH. Wyniki te dotyczyły przypadków izolowanej trisomii chromosomu 7 u dwóch chorych ze zwężeniem PT w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki oraz u jednego pacjenta z łagodnym zwężeniem DŻ. Natomiast tak jak we wcześniejszych badaniach,[6,68] nie obserwowałam wyników fałszywie dodatnich w przypadku polisomii. W związku z tym obecność polisomii w wymazach szczoteczkowych ze zwężeń PT i/lub DŻ powinna być interpretowana tak jak stwierdzenie komórek nowotworowych w badaniu cytologicznym. Z kolei trisomia chromosomu 7 może występować zarówno w chorobach nienowotworowych, np. w komórkach płynu maziowego u chorych

na reumatoidalne zapalenie stawów, czy chorobę zwyrodnieniową stawów,[80,81] jak i w innych procesach nowotworowych, np. raku jelita grubego,[82] tarczycy,[83] czy nerki.[84] W związku z tym nie może być uznawana za jedyny wystarczający wskaźnik złośliwej etiologii zwężenia PT i/lub DŻ. Należy mieć jednak na uwadze fakt, że u niektórych pacjentów wczesny stan przednowotworowy może manifestować się jedynie izolowaną trisomią chromosomu 7. Barr Fritcher i wsp.[68] wykazali, że u ok. 50% chorych ze zwężeniem DŻ i tym zaburzeniem chromosomalnym w ciągu dwóch lat rozpoznawano raka. Sugerują oni więc, że pacjenci z izolowaną trisomią chromosomu 7 powinni być leczeni zachowawczo, jednak wymagają ścisłego monitorowania pod kątem rozwoju nowotworu co 6 miesięcy w ciągu dwóch lat od stwierdzenia tej aberracji.

Pierwsza publikacja oceniająca rolę FISH w diagnostyce złośliwych zwężeń DŻ ukazała się w 2004 roku.[51] W tej pracy Kipp i wsp. przeanalizowali 131 wymazów ze zwężeń DŻ. Wykazali oni wyższą czułość FISH w stosunku do cytologii (34% vs. 15%) przy niższej swoistości (91% vs. 98%). Kolejny artykuł prezentujący to zagadnienie ukazał się w 2006 roku.[6] Było to badanie prowadzone praktycznie przez ten sam zespół z Mayo Clinic (Rochester, Minnesota), obejmujące 233 pacjentów ze zwężeniami DŻ. Potwierdziło ono wyższą czułość FISH w porównaniu z konwencjonalną cytologią (63% vs. 9% w zwężeniach zlokalizowanych proksymalnie i 59% vs. 41% w zwężeniach położonych dystalnie). Ponadto autorzy wykazali poprawę czułości cytologii z 20% do 41%, gdy wyniki podejrzone i atypowe były interpretowane jako dodatnie, przy niewielkim spadku swoistości ze 100% do 96%. Według nich wyniki te sugerują, że cytologowie mogą być nadmiernie ostrożni w rozpoznawaniu złośliwych zmian w cytologii wymazów szczoteczkowych. Barr Fritcher i wsp.[68] ocenili wyniki cytologii i FISH na bardzo dużej grupie pacjentów ze zwężeniami DŻ (odpowiednio 493 i 484 chorych). Wykazali statystycznie znamiennej różnicę pomiędzy czułością polisomii stwierdzanej za pomocą FISH a cytologii w diagnostyce złośliwych zwężeń DŻ (42,9% vs.

20,1%) przy takiej samej swoistości 99,6% dla obu metod. Gdy za wynik dodatni FISH uznawano polisomię i trisomię, to czułość badania wzrosła do 62,6%, jednak wiązało się to z obniżeniem swoistości do 79,6%. Według wykonanego przez nich modelu regresji logistycznej do czynników związanych z obecnością raka u tych pacjentów należą wynik FISH, wynik cytologii, obecność PSC i wiek. Ryzyko raka u chorych z polisomią jest 77 razy wyższe niż u tych z prawidłowym wynikiem FISH, podczas gdy u tych z trisomią tylko 1,8 razy wyższy. W przypadku podejrzanego wyniku cytologii ryzyko raka jest 6 razy wyższe niż u chorych z wynikiem ujemnym.

Ograniczeniem mojej pracy jest zastosowanie do wykonania FISH zestawu sond DNA przeznaczonego do diagnostyki raka pęcherza moczowego (zestaw UroVysion Bladder Cancer Kit), który wykrywa aneuploidię chromosomów 3, 7 i 17 oraz utratę locus 9p21.[73] We wcześniejszych doniesieniach[6,51,68] wykazano przydatność tego zestawu w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń DŻ. W związku z tym, że nowotworowe zwężenia DŻ są często spowodowane przez nacieki raka głowy trzustki oraz że w badaniach tych nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy czułością metody w przypadku zwężeń DŻ spowodowanych przez raka dróg żółciowych i raka trzustki, zdecydowałam się użyć zestawu UroVysion również w mojej pracy. W przypadku raka trzustki najczęściej stwierdzane zaburzenia ilościowe dotyczą chromosomów 3, 5, 7, 9, 13, 17, 18 i 22.[71] Różnice w profilu zaburzeń chromosomalnych pomiędzy rakiem pęcherza moczowego a rakiem trzustki i rakiem dróg żółciowych mogą wpływać negatywnie na skuteczność zestawu UroVysion w rozpoznawaniu złośliwych zwężeń PT i/lub DŻ. W związku z tym wyniki fałszywie ujemne FISH mogą wynikać nie tylko z błędu pobrania polegającego na braku komórek nowotworowych w uzyskanych wymazach, ale także z problemów technicznych wynikających z charakterystyki użytych sond molekularnych. Konieczne są dalsze badania, dzięki którym możliwe będzie stworzenie bardziej swoistego zestawu sond DNA wykrywającego nieprawidłowości typowe dla raka trzustki i

raka dróg żółciowych oraz ocena wpływu zastosowania takiego zestawu na czułość FISH w diagnostyce tych patologii.

Dotychczas nie opublikowano żadnej pracy określającej przydatność FISH wykonywanej na bezpośrednich rozmazach z materiału uzyskanego podczas wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ. We wcześniejszych publikacjach FISH wykonywano na preparatach uzyskanych dzięki wyplukaniu szczoteczki w środku utrwalającym komórki oraz odwirowaniu uzyskanego materiału. W mojej pracy spośród 81 wymazów pobranych w celu wykonania FISH, 14 (17,3%) okazało się niediagnostycznych ze względu na zbyt małą ilość materiału do przeprowadzenia hybrydyzacji. Były to 3 wymazy ze zwężeń PT i 11 ze zwężeń DŻ. Ta technika wykonania preparatów ma więc ograniczoną skuteczność w przypadku FISH. Tak duża liczba nieprawidłowych rozmazów wpływa negatywnie na wartość diagnostyczną metody, dlatego też należy dążyć do zminimalizowania wpływu błędów technicznych i błędu związanego z pobieraniem materiału na wyniki badania. Skuteczniejszą metodą przygotowania preparatów do analizy za pomocą FISH wydaje się opisywana wcześniej technika płukania szczoteczki endoskopowej w specjalnym roztworze utrwalającym komórki, z którego następnie wykonywano preparaty.[6,51,68] Stosując tę metodę Barr Fritcher i wsp.[68] otrzymali 43/540 (7,96%) ubogokomórkowych preparatów, które nie nadawały się do oceny.

Moje badanie udowodniło, że wymazy szczoteczkowe ze zwężeń PT są wiarygodnym materiałem do oceny cytologicznej oraz wykrywania zaburzeń chromosomalnych za pomocą FISH. Według niektórych doniesień wymazy szczoteczkowe ze zwężeń PT charakteryzują się niższą czułością niż wymazy z DŻ ze względu na częstsze problemy techniczne z uzyskaniem materiału ze zwężeń PT związane z trudniej dostępną lokalizacją zmiany.[46,61] Z drugiej strony, gdy procedura wykonywana jest przez doświadczonego endoskopistę przy użyciu dobrego sprzętu, wówczas dokładność cytologii wymazów szczoteczkowych pobieranych z PT i DŻ może być zbliżona.[52] Inni autorzy sugerują, że w przypadku raka trzustki wymazy szczoteczkowe z PT cechują

się wyższą czułością, ponieważ materiał do badania jest pobierany bezpośrednio ze zmiany nowotworowej, podczas gdy zwężenie DŻ spowodowane rakiem trzustki jest związane z naciekiem guza z zewnątrz.[52]

W moim badaniu czułość wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT była wyższa niż DŻ zarówno dla cytologii (42,86% vs. 32,81%), jak i FISH (76,47% vs. 57,69%), jednak różnice nie były istotne statystycznie. Gdy atypię interpretowano jako wynik dodatni, to różnica pomiędzy czułością cytologii wymazów z PT i DŻ była minimalna (53,57% vs. 51,56%). Jediną statystycznie istotną różnicę pomiędzy wymazami z PT i DŻ obserwowano w przypadku WPWU cytologii. Była ona wyższa dla wymazów z PT zarówno, gdy interpretowano atypię jako wynik ujemny (68% vs. 33,85%), jak i gdy traktowano atypię jako wynik dodatni (72,34% vs. 41,51%). Świadczy to o większej wiarygodności wyniku ujemnego cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT. Większy odsetek wyników fałszywie ujemnych w grupie pacjentów ze zwężeniami DŻ w porównaniu z PT (81,13% vs. 34,04% gdy atypia była uważana za wynik ujemny i 58,49% vs. 27,66% gdy atypię interpretowano jako wynik dodatni) może wynikać z etiologii złośliwych zwężeń.

W przypadku PT zdecydowana większość zwężeń nowotworowych (26/29, 89,65%) była spowodowana rakiem trzustki, czyli procesem nowotworowym wywodzącym się z nabłonka przewodów trzustkowych. Natomiast większość złośliwych zwężeń DŻ (42/65, 64,62%) wynikała z procesu nowotworowego pochodzącego pierwotnie z zewnątrz przewodów żółciowych. W tej grupie pacjentów rak dróg żółciowych stanowił przyczynę 23/65 (35,38%) zwężeń. Tyle samo zwężeń DŻ powodował rak trzustki, a pozostałe przypadki dotyczyły chorych z rakiem pęcherzyka żółciowego (8/65, 12,31%), rakiem brodawki Vatera (6/65, 9,23%) i innymi nowotworami (5/65, 7,7%). W tej sytuacji powiększanie się guza może klinicznie objawiać się zwężeniem DŻ, jednak naciek nowotworowy pochodzący z zewnątrz przewodów żółciowych może być pokryty prawidłowym nabłonkiem od strony światła przewodu. Może to wpływać negatywnie na zawartość komórek nowotworowych w materiale pobranym za pomocą wymazów szczoteczkowych ze zwężeń złośliwych DŻ. Innym



wytlumaczeniem wyższej czułości wymazów z PT w stosunku do DŻ w tym badaniu może być częściej wykonywane poszerzanie mechaniczne złośliwych zwężeń PT przed pobraniem wymazu (12/29, 41,38% vs. 19/65, 29,23%). Według niektórych autorów ta procedura może wpływać korzystnie na ilość komórek nowotworowych w pobranym materiale.[74]

Vandervoort i wsp.[52] postanowili porównać dokładność wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ oraz częstość występowania powikłań procedury. Ocenili 42 wymazy z PT i 101 z DŻ. W ich badaniu również czułość i WPWU cytologii wymazów z PT była wyższa niż z DŻ (odpowiednio 50% vs. 34,4% i 59,2% vs. 46,8%), jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Niewielki wzrost czułości z 50% do 57,1% odnotowano w grupie wymazów z PT, gdy analizowano tylko wyniki cytologii pacjentów z rakiem trzustki. Autorzy ocenili też wpływ interpretacji wyników atypowych na czułość i swoistość metody. Atypię rozpoznano w 16/143 (11%) preparatów, z których 4 pochodziły od chorych z łagodnym zwężeniem. Gdy atypię interpretowano jako wynik dodatni, wówczas czułość cytologii wzrosła zarówno dla wymazów z PT (z 50% do 58,3%) jak i dla DŻ (z 34,4% do 50%). Wpłynęło to jednak negatywnie na swoistość wymazów z DŻ, która spadła ze 100% do 89%. Wszyscy badani bez nowotworu, u których stwierdzono atypię, mieli przed pobraniem wymazu założony plastikowy stent do DŻ. Autorzy badania sugerują, że obecność protezy w DŻ przez okres kilku miesięcy może indukować łagodne zmiany w komórkach nabłonka imitujące proces nowotworowy, szczególnie w przypadku przewlekłych chorób zapalnych (przewlekłe zapalenie trzustki, czy pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych).

W mojej pracy powikłania po ECPW stwierdzono u 6,6% chorych – 4,7% ze zwężeniem PT i 8,05% ze zwężeniem DŻ. Według kryteriów opisanych przez Cottona i wsp.[77] poważne powikłania wystąpiły tylko u 2 pacjentów po wymazach z PT, a nie obserwowałam ich wśród chorych ze zwężeniem DŻ. Ostry rzut zapalenia trzustki (zakończony zgonem) wystąpił tylko u jednej chorej (0,7%). Była to pacjentka z przewlekłym zapaleniem trzustki, u której pobrano

wymaz ze zwężenia PT, a po zabiegu nie wprowadzono stentu do PT. U pozostałych pacjentów z badanej populacji występowały powikłania o łagodnym lub umiarkowanym stopniu ciężkości. Wszyscy mieli protezowany PT lub DŻ podczas zabiegu. Opisywana częstość ostrego zapalenia trzustki (OZT) wikłającego wymazy szczoteczkowe wykonywane podczas ECPW waha się w granicach 0% do 33,3%.[46,52,54,55] W badaniu Vandervoorta i wsp.[52] odsetek OZT po ECPW wynosił dla wymazów z PT 21,5%, a dla DŻ 10,9%. Zdecydowana większość przypadków OZT była łagodna. Nie obserwowano natomiast powikłań u chorych, którym po zabiegu wprowadzono protezę do PT.

Najwyższą czułość obserwowałam, gdy za wynik dodatni uznawałam obecność jednej z następujących zmiennych: złośliwego rozpoznania w cytologii lub obecności atypii lub dodatniej FISH. W związku z tym jednoczesna ocena zmian cytologicznych i FISH w wymazach ze zwężeń PT i/lub DŻ wydaje się optymalną strategią diagnostyczną. Przy bardzo wysokiej swoistości cytologii sięgającej 100%, uzasadnione wydaje się wykonywanie FISH tylko u pacjentów z ujemnym wynikiem konwencjonalnej cytologii. Należy także pamiętać, że rozpoznanie cytologicznej atypii silnie sugeruje złośliwą etiologię zwężenia, więc taki wynik należy zawsze rozpatrywać w szerszym klinicznym kontekście.

## 7. WNIOSKI

1. Rola cytologii soku trzustkowego w diagnostyce różnicowej zwężeń przewodu trzustkowego głównego jest ograniczona w praktyce klinicznej.
2. Wymazy szczoteczkowe są przydatne w diagnostyce różnicowej zwężeń przewodu trzustkowego głównego.
  - 2.1. Cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego charakteryzuje się niską czułością, przy bardzo wysokiej swoistości i wartości predykcyjnej wyniku dodatniego oraz dość wysokiej wartości predykcyjnej wyniku ujemnego.
  - 2.2. Cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego cechuje się wyższą czułością i wartością predykcyjną wyniku ujemnego niż cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń dróg żółciowych.
  - 2.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego charakteryzuje się umiarkowaną czułością i wartością predykcyjną wyniku ujemnego, przy dość wysokiej swoistości i wartości predykcyjnej wyniku dodatniego.
  - 2.4. Wymazy szczoteczkowe ze zwężeń przewodu trzustkowego głównego są równie wiarygodnym materiałem do wykonania FISH co wymazy ze zwężeń DŻ. Cechują się wyższą czułością i wartością predykcyjną wyniku ujemnego, przy nieznacznie niższej swoistości i wartości predykcyjnej wyniku dodatniego w stosunku do FISH wymazów ze zwężeń dróg żółciowych.
  - 2.5. FISH cechuje się wyższą czułością, ale niższą swoistością niż rutynowa cytologia w diagnostyce zwężeń przewodu trzustkowego głównego. Najwyższą wartość diagnostyczną ma połączenie obu tych metod.

2.6. Zakwalifikowanie atypii do wyników dodatnich cytologii znamienne poprawia czułość metody, przy niezmięnionej wysokiej swoistości i wartości predykcyjnej wyniku dodatniego oraz nieznacznie zwiększa wartość predykcyjną wyniku ujemnego cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń przewodu trzustkowego i dróg żółciowych.

## 8. PIŚMIENNICTWO

1. Weber A, Schmid RM, Prinz C. Diagnostic approaches for cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14:4131-6.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1605-17.
3. Brand R. The diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001;7:287-97.
4. Fogel EL. Endoscopic Evaluation and Management of Pancreatic Duct Strictures. *Tech Gastrointest Endosc* 2004;6:122-9.
5. Stewart CJ, Mills PR, Carter R, O'Donohue J, Fullarton G, Imrie CW, Murray WR. Brush cytology in the assessment of pancreatobiliary strictures: a review of 406 cases. *J Clin Pathol* 2001;54:449-55.
6. Moreno Luna LE, Kipp B, Halling KC, Sebo TJ, Kremers WK, Roberts LR, Barr Fritcher EG, Levy MJ, Gores GJ. Advanced cytologic techniques for the detection of malignant pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology* 2006;131:1064-72.
7. Hall JG, Pappas TN. Current management of biliary strictures. *J Gastrointest Surg* 2004;8:1098-110.
8. Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Muri Boberg K, Shneider B, Gores GJ. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010;51:660-78.
9. Razumilava N, Gores GJ, Lindor KD. Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2011;54:1842-52.
10. Lindkvist B, Benito de Valle M, Gullberg B, Bjornsson E. Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden. *Hepatology* 2010;52:571-7.
11. Kornfeld D, Ekborn A, Ihre T. Survival and risk of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. A population-based study. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1042-5.
12. Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Loof L, Danielsson A, Hultcrantz R, Lindgren S, Prytz H, Sandberg-Gertzen H, Almer S,

- Granath F, Broome U. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;36:321-7.
13. Claessen MMH, Vleggaar FP, Tytgat KMAJ, Siersema PD, van Buuren HR. High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2009;50:158-64.
  14. Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2008;48:1106-17.
  15. Saif MW. Pancreatic neoplasm in 2011: an update. *JOP* 2011;12:316-21.
  16. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-20.
  17. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
  18. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
  19. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
  20. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic Cancer: State-of-the-Art Care. *CA Cancer J Clin* 2000;50:241-68.
  21. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-57.
  22. Takhar AS, Palaniappan P, Dhingsa R, Lobo DN. Recent developments in diagnosis of pancreatic cancer. *BMJ* 2004;329:668-73.
  23. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2696-707.

24. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruzsniwski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002;51:849-52.
25. Cavestro GM, Comparato G, Nouvenne A, Sianesi M, Di Mario F. The race from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *J Pancreas* 2003;4:165-8.
26. Taylor B. Carcinoma of the head of the pancreas versus chronic pancreatitis: diagnostic dilemma with significant consequences. *World J Surg* 2003;27:1249-57.
27. Michl P, Pauls S, Gress TM. Evidence-based diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:227-51.
28. Bronstein YL, Loyer EM, Kaur H, Choi H, David C, DuBrow RA, Broemeling LD, Cleary KR, Charnsangavej C. Detection of small pancreatic tumors with multiphasic helical CT. *AJR Am J Roentgenol* 2004;182:619-23.
29. Karmazanowsky G, Fedorov V, Kubyshekin V, Kotchatkov A. Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability. *Abdom Imaging* 2005;30:488-500.
30. Santo E. Pancreatic cancer imaging: which method? *J Pancreas* 2004;5:253-7.
31. Gines A, Wiersema MJ, Clain JE, Pochron NL, Rajan E, Levy MJ. Prospective study of a Trucut needle for performing EUS-guided biopsy with EUS-guided FNA rescue. *Gastrointest Endosc* 2005;62:597-601.
32. Gheonea DI, Saftoiu A. Beyond conventional endoscopic ultrasound: elastography, contrast enhancement and hybrid techniques. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:423-9.
33. Saftoiu A. State-of-the-art imaging techniques in endoscopic ultrasound. *World J Gastroenterol* 2011;17:691-6.
34. Iglesias-Garcia J, Larino-Noia J, Abdulkader I, Forteza J, Dominguez-Munoz JE. Quantitative endoscopic ultrasound elastography: an accurate

- method for the differentiation of solid pancreatic masses. *Gastroenterology* 2010;139:1172-80.
35. Giovannini M, Thomas B, Erwan B, Christian P, Fabrice C, Benjamin E, Genevieve M, Paolo A, Pierre D, Robert Y, Walter S, Hanz S, Carl S, Christoph D, Pierre E, Jean-Luc VL, Jaques D, Peter V, Andrian S. Endoscopic ultrasound elastography for evaluation of lymph nodes and pancreatic masses: a multicenter study. *World J Gastroenterol* 2009;15:1587-93.
  36. Baron TH, Mallery JS, Hirota WK, Goldstein JL, Jacobson BC, Leighton JA, Waring JP, Faigel DO. The role of endoscopy in the evaluation and treatment of patients with pancreatobiliary malignancy. *Gastrointest Endosc* 2003;58:643-9.
  37. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:115-25.
  38. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011;54:173-84.
  39. Ben-Menachem T. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:615-7.
  40. Olnes MJ, Erlich R. A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology* 2004;66:167-79.
  41. Larghi A, Waxman I. Differentiating benign from malignant idiopathic biliary strictures: are we there yet? *Gastrointest Endosc* 2007;66:97-9.
  42. Smoczyński M, Drobińska-Jurowiecka A, Wypych J, Wegner J. Clinical use of antigen Ca 19-9 evaluation in the serum and pancreatic juice in differential diagnosis of pancreatic cancer. *Gastroenterol Pol* 2005;12:121-5.
  43. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9:67-81.
  44. Micames C, Jowell PS, White R, Paulson E, Nelson R, Morse M, Hurwitz H, Pappas T, Tyler D, McGrath K. Lower frequency of peritoneal



- carcinomatosis in patients with pancreatic cancer diagnosed by EUS-guided FNA vs percutaneous FNA. *Gastrointest Endosc* 2003;58:690-5.
45. De Bellis M, Sherman S, Fogel EL, Cramer H, Chappo J, McHenry L, Watkins JL, Lehman GA. Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 1). *Gastrointest Endosc* 2002;56:552-61.
46. Pugliese V, Pujic N, Saccomanno S, Gatteschi B, Pera C, Aste H, Ferrara GB, Nicolo G. Pancreatic intraductal sampling during ERCP in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: cytologic studies and k-ras-2 codon 12 molecular analysis in 47 cases. *Gastrointest Endosc* 2001;54:595-9.
47. Nakaizumi A, Masaharu T, Uehara H, Takenaka A, Ohigashi H, Ishikawa O, Ishiguro S. Usefulness of simple endoscopic aspiration cytology of pancreatic juice for diagnosis of early pancreatic neoplasm. *Dig Dis Sci* 1997;42:1796-803.
48. De Bellis M, Sherman S, Fogel EL, Cramer H, Chappo J, McHenry L, Watkins JL, Lehman GA. Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 2). *Gastrointest Endosc* 2002;56:720-30.
49. Devereaux BM, Fogel EL, Bucksot L, Shelly LA, Lehman GA, Sherman S. Clinical utility of stent cytology for the diagnosis of pancreaticobiliary neoplasms. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1028-31.
50. Osnes M, Serck-Hanssen A, Myren J. Endoscopic retrograde brush cytology (ERBC) of the biliary and pancreatic ducts. *Scand J Gastroenterol* 1975;10:829-31.
51. Kipp BR, Standheim LM, Halling SA, Pochron NL, Harmsen S, Nagorney DM, Sebo TJ, Therneau TM, Gores GJ, de Groen PC, Baron TH, Levy MJ, Halling KC, Roberts LR. A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1675-81.
52. Vandervoort J, Soetkino RM, Montes H, Lichtenstein DR, Van Dam J, Ruyman FW, Cibas ES, Carr-Locke DL. Accuracy and complication rate

- of brush cytology from bile duct versus pancreatic duct. *Gastrointest Endosc* 1999;49:322-7.
53. Logorno R, Kurtycz DF, Molina CP, Trivedi VA, Wong JY, Block KP. Analysis of false-negative diagnoses on endoscopic brush cytology of biliary and pancreatic duct strictures. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:387-92.
54. Wakatsuki T, Irisawa A, Bhutani MS, Hikichi T, Shibukawa G, Takagi T, Yamamoto G, Takahashi Y, Yamada Y, Watanabe K, Obara K, Suzuki T, Sato Y. Comparative study of diagnostic value of cytologic sampling by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration and that by endoscopic retrograde pancreatography for the management of pancreatic mass without biliary stricture. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1707-11.
55. Uchida N, Kamada H, Tsutsui K, Ono M, Aritomo Y, Masaki T, Kushida Y, Haba R, Nakatsu T, Kuriyama S. Utility of pancreatic duct brushing for diagnosis of pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol* 2007;42:657-62.
56. Van Laethem JL, Bourgeois V, Parma J, Delhaye M, Cochaux P, Velu T, Deviere J, Cremer M. Relative contribution of Ki-ras gene analysis and brush cytology during ERCP for the diagnosis of biliary and pancreatic diseases. *Gastrointest Endosc* 1998;47:479-85.
57. Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Manton B, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001;96:700-4.
58. Furuya N, Kawa S, Akamatsu S, Furihata K. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997;113:593-8.
59. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol* 2004;10:471-5.

60. Zhou GX, Huang JF, Li ZS, Xu GM, Liu F, Zhang H. Detection of K-ras point mutation and telomerase activity during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1337-40.
61. Elek G, Gyokeres T, Schafer E, Burai M, Pinter F, Pap A. Early diagnosis of pancreaticobiliary duct malignancies by brush cytology and biopsy. *Pathol Oncol Res* 2005;11:145-55.
62. Ishimaru S, Itoh M, Henada K, Tsuchida A, Iwao T, Kajiyama G. Immunocytochemical detection of p53 protein from pancreatic duct brushings in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996;77:2233-9.
63. Sturm PD, Hruban RH, Ramsoekh TB, Noorduynd LA, Tytgat GN, Gouma DJ, Offerhaus GJ. The potential diagnostic use of K-ras codon 12 and p53 alterations in brush cytology from the pancreatic head region. *J Pathol* 1998;186:247-53.
64. Stewart CJR, Burke GM. Value of p53 immunostaining in pancreaticobiliary brush cytology specimens. *Diagn Cytopathol* 2000;23:308-13.
65. Uemura K, Hiyama E, Murakami Y, Kanehiro T, Ohge H, Sueda T, Yokohama T. Comparative analysis of K-ras point mutation, telomerase activity, and p53 overexpression in pancreatic tumors. *Oncol Rep* 2003;10:277-83.
66. Mishra G, Zhao Y, Sweeney J, Pineau BC, Case D, Ho C, Blackstock W, Geisinger K, Howerton R, Levine E, Shen P, Ibdah J. Determination of qualitative telomerase activity as an adjunct to the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest Endosc* 2006;6:648-54.
67. Uehara H, Nakaizumi A, Tatsua M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, Kakizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2513-8.

68. Barr Fritcher EG, Kipp BR, Halling KC, Oberg TN, Bryant SC, Tarrell RF, Gores GJ, Levy MJ, Clayton AC, Sebo TJ, Roberts LR. A multivariable model using advanced cytologic methods for the evaluation of indeterminate pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology* 2009;136:2180-6.
69. Barr Fritcher EG, Halling KC. Advanced cytologic approaches for the diagnosis of pancreatobiliary cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:259-64.
70. Bergquist A, Tribukait B, Glaumann H, Broome U. Can DNA cytometry be used for evaluation of malignancy and premalignancy in bile duct strictures in primary sclerosing cholangitis? *J Hepatol* 2000;33:873-7.
71. Dewald GW, Smyrk TC, Thorland EC, McWilliams RR, Van Dyke DL, Keefe JG, Belongie KJ, Smoley SA, Knutson DL, Fink SR, Wiktor AE, Petersen GM. Fluorescence in situ hybridization to visualize genetic abnormalities in interphase cells of acinar cell carcinoma, ductal adenocarcinoma, and islet cell carcinoma of the pancreas. *Mayo Clin Proc* 2009;84:801-10.
72. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2:116-23.
73. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, Sebo TJ, Cheville JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA, Jenkins RB, O'Kane DJ. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 2002;177:2001-6.
74. Farrell RJ, Jain AK, Brandwein SL, Wang H, Chuttani R, Pleskow DK. The combination of stricture dilation, endoscopic needle aspiration, and biliary brushings significantly improves diagnostic yield from malignant bile duct strictures. *Gastrointest Endosc* 2001;54:587-94.

75. De Bellis M, Fogel EL, Sherman S, Watkins JL, Chappo J, Younger C, Cramer H, Lehman GA. Influence of stricture dilation and repeated brushing on the cancer detection rate of brush cytology in the evaluation of malignant biliary obstruction. *Gastrointest Endosc* 2003;58:176-82.
76. Ornellas LC, da Cunha Santos A, Nakao FS, Ferrari AP. Comparison between endoscopic brush cytology performed before and after biliary stricture dilation for cancer detection. *Arq Gastroenterol* 2006;43:20-3.
77. Cotton PB, Lehman G, Vennes J, Geenen JE, Russell RC, Meyers WC, Liquory C, Nickl N. Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointest Endosc* 1991;37:383-93.
78. Wight CO, Zaitoun AM, Boulton-Jones JR, Dunkley C, Beckingham IJ, Ryder SD. Improving diagnostic yield of biliary brushings cytology for pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. *Cytopathology* 2004;15:87-92.
79. McGuire DE, Venu RP, Brown RD, Etzkorn KP, Glaws WR, Abu-Hammour A. Brush cytology for pancreatic carcinoma: an analysis of factors influencing results. *Gastrointest Endosc* 1996;44:300-4.
80. Tascioglu F, Durak B, Oner C, Artan S. Trisomy 7 in synovial fluid cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005;25:571-5.
81. Broberg K, Toksvig-Larsen S, Lindstrand A, Mertens F. Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovial. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:310-5.
82. Bomme L, Lothe RA, Bardi G, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosomes 1, 7, 13 and 20. *Int J Cancer* 2001;92:816-23.
83. Mazzucchelli L, Burckhardt E, Hirsiger H, Kappeler A, Laissue JA. Interphase cytogenetics in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol* 2000;31:854-9.
84. Limon J, Mrozek K, Heim S, Elfving P, Nedoszytko B, Babińska M, Mandahl N, Lundgren R, Mitelman F. On the significance of trisomy 7

and sex chromosome loss in renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;49:259-63.

## 9. STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena przydatności cytologii soku trzustkowego i wymazów szczoteczkowych w diagnostyce różnicowej zwężeń przewodu trzustkowego głównego. Za cele szczegółowe uznano ocenę roli cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i porównanie jej przydatności z cytologią ze zwężeń dróg żółciowych (DŻ), ocenę roli fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i porównanie jej przydatności z FISH ze zwężeń DŻ, porównanie przydatności rutynowej cytologii i FISH w diagnostyce zwężeń PT oraz ocena wpływu zakwalifikowania atypii do wyników dodatnich lub ujemnych na wynik cytologii wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT i DŻ.

Do badania zakwalifikowano 151 chorych (73 kobiety i 78 mężczyzn, w wieku 19-91 lat, średnia wieku 62,92 lata). Stwierdzono 64 zwężenia PT (29 złośliwych, 35 łagodnych) i 87 zwężeń DŻ (65 złośliwych, 22 łagodne). Materiał do badania pobierano w czasie endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej (ECPW). Preparaty do oceny cytologicznej przekazywano do Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wymazy interpretowano jako złośliwe, atypowe lub łagodne. Preparaty do badania techniką FISH przekazywano do Zakładu Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. FISH wykonywano za pomocą zestawu UroVysion wykrywającego aneuploidię 3, 7 i 17 chromosomu oraz delecję w locus 9p21. Wynik był uznawany za dodatni jeśli obserwowano polisomię któregośkolwiek chromosomu albo trisomię chromosomu 3 lub 7 w co najmniej 5 komórkach. Analizie poddano materiał cytologiczny 148 chorych oraz wyniki FISH 67 pacjentów. Obliczono czułość, swoistość, wartość predykcyjną wyniku dodatniego (WPWD) i wartość predykcyjną wyniku ujemnego (WPWU) dla cytologii i FISH.

Sok trzustkowy pobrano u 8 pacjentów ze zwężeniem PT. Czulość cytologii wymazów szczoteczkowych dla zwężeń PT i DŻ wyniosła 35,87% przy swoistości 100%, WPWD 100%, a WPWU 48,7%. Stwierdzono wyższą czulość i WPWU cytologii w przypadku zwężeń PT w porównaniu do DŻ (odpowiednio 42,86% vs. 32,81%, NS i 68% vs. 33,85%,  $p < 0,000$ ) przy swoistości i WPWD 100% dla obu typów zwężeń. Gdy jako wynik dodatni interpretowano obecność atypii, czulość cytologii wzrosła do 52,17% dla całej grupy, 53,57% dla PT i 51,56% dla DŻ (52,17% vs. 35,87%,  $p < 0,019$ ). WPWU wzrosła do 56% (56% vs. 48,7%, NS) dla całej grupy, 72,34% dla PT i 41,51% dla DŻ (72,34% vs. 41,51%,  $p < 0,002$ ). Swoistość i WPWD pozostały na poziomie 100%.

Czulość FISH była wyższa niż cytologii zarówno w przypadku interpretacji atypii jako wyniku ujemnego, jak i atypii jako wyniku dodatniego (odpowiednio 65,12% vs. 35,87%,  $p < 0,001$  i 65,12% vs. 52,17%, NS). Swoistość i WPWD FISH była niższa niż cytologii (odpowiednio 87,5% vs. 100%,  $p < 0,025$  i 90,32% vs. 100%, NS), a WPWU wyższa (58,33% vs. 48,7% dla atypii jako wyniku ujemnego i 56% dla atypii jako wyniku dodatniego, NS). Czulość i WPWU FISH były wyższe dla wymazów z PT w porównaniu do DŻ (odpowiednio 76,47% vs. 57,69%, NS i 75% vs. 45%, NS), a swoistość i WPWD niższe dla PT (odpowiednio 85,71% vs. 93,75%, NS i 86,67% vs. 93,75%, NS).

Gdy za wynik dodatni uznawano obecność jednej z następujących zmiennych: dodatniej cytologii lub obecności atypii lub dodatniej FISH, wówczas czulość badania była wyższa w porównaniu z cytologią (85,37% vs. 35,87%,  $p < 0,000$  dla atypii jako wyniku ujemnego i 85,37% vs. 52,17%,  $p < 0,000$  dla atypii jako wyniku dodatniego), jak i FISH (85,37% vs. 65,12%,  $p < 0,028$ ). Swoistość była niższa niż cytologii (86,96% vs. 100%,  $p < 0,022$ ) i FISH (86,96% vs. 87,5%, NS). WPWD była niższa niż cytologii (92,11% vs. 100%, NS) i wyższa niż FISH (92,11% vs. 90,32%, NS), a WPWU była wyższa niż cytologii i FISH (76,92% vs. odpowiednio 48,7% i 58,33%, NS).



Porównując wymazy z PT i DŻ w tej grupie obserwowano wyższą czułość i WPWU dla PT (odpowiednio 93,75% vs. 80%, NS i 91,67% vs. 64,29%, NS) oraz niższą swoistość i WPWD (odpowiednio 84,61% vs. 90%, NS i 88,24% vs. 95,24%, NS).

Rola cytologii soku trzustkowego w diagnostyce różnicowej zwężeń PT jest ograniczona praktyce klinicznej. Wymazy szczoteczkowe są przydatne w diagnostyce różnicowej zwężeń PT. Cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT charakteryzuje się niską czułością, przy bardzo wysokiej swoistości i WPWD oraz dość wysokiej WPWU. Cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT cechuje się wyższą czułością i WPWU niż cytologia wymazów szczoteczkowych ze zwężeń DŻ. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) wymazów szczoteczkowych ze zwężeń PT charakteryzuje się umiarkowaną czułością i WPWU, przy dość wysokiej swoistości i WPWD. Wymazy szczoteczkowe ze zwężeń PT są równie wiarygodnym materiałem do wykonania FISH co wymazy ze zwężeń DŻ. Cechują się wyższą czułością i WPWU, przy nieznacznie niższej swoistości i WPWD w stosunku do FISH wymazów ze zwężeń DŻ. FISH charakteryzuje się wyższą czułością, ale niższą swoistością niż rutynowa cytologia w diagnostyce zwężeń PT. Najwyższą wartość diagnostyczną ma połączenie obu tych metod. Zakwalifikowanie atypii do wyników dodatnich cytologii znamienne poprawia czułość metody, przy niezmięnionej wysokiej swoistości.

## 10.ABSTRACT

The aim of this work was to assess the role of pancreatic juice cytology and endoscopic brushings in differential diagnosis of the main pancreatic duct (PD) strictures. The particular aims were to assess the role of brush cytology from PD strictures and to compare its utility with brush cytology from bile duct (BD) strictures, to assess the role of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) from PD strictures brushings and to compare its utility with FISH from BD brushings, to compare the role of routine cytology and FISH in diagnosis of PD strictures and to assess the influence of atypia interpreted as a positive or negative result on the results of brush cytology from PD and BD strictures.

The study population consisted of 151 patients (73 women and 78 men, aged 19-91 years, mean age 62,92 years). There were 64 PD strictures (29 malignant, 35 benign) and 87 BD strictures (65 malignant, 22 benign). The samples were obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). Cytological assessment of the specimens was performed in the Department of Pathology, Medical University of Gdańsk. They were interpreted as malignant, atypical or benign. The smears for FISH technique were sent to the Department of Biology and Genetics, Medical University of Gdańsk. FISH was performed with the use of UroVysion set that detects aneuploidy of chromosome 3, 7 and 17 and deletion of locus 9p21. The results were regarded as positive when at least 5 cells revealed polysomy of any chromosome or trisomy of chromosome 3 or 7. The analysis of cytological material was performed in case of 148 patients and FISH results were assessed in 67 patients. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated.

Pancreatic juice was collected only from 8 patients with PD strictures. Sensitivity of brush cytology for PD and BD strictures was 35.87%, specificity 100%, PPV 100% and NPV 48.7%. Sensitivity and NPV of brush cytology from PD strictures were higher in comparison to BD brushings (42.86% vs. 32.81%,

NS and 68% vs. 33.85%,  $p < 0.000$  respectively) with specificity and PPV of 100% for both types of strictures. When atypia was interpreted as a positive result then sensitivity of brush cytology raised to 52.17% for the whole group (52.17% vs. 35.87%,  $p < 0.019$ ), 53.57% for PD and 51.56% for BD strictures. PPV increased to 56% (56% vs. 48.7%, NS) for the whole group, 72.34% for PD and 41.51% for BD strictures (72.34% vs. 41.51%,  $p < 0.002$ ). Specificity and PPV remained 100%.

Sensitivity of FISH was higher than of cytology both for atypia as a positive and as a negative result (65.12% vs. 35.87%,  $p < 0.001$  and 65.12% vs. 52.17%, NS, respectively). Specificity and PPV of FISH was lower than that of cytology (87.5% vs. 100%,  $p < 0.025$  and 90.32% vs. 100%, NS, respectively), while NPV was higher (58.33% vs. 48.7% for atypia as a negative result and 56% for atypia as a positive result, NS). Sensitivity and NPV of PD brushings were higher when compared to BD (76.47% vs. 57.69%, NS and 75% vs. 45%, NS, respectively). Specificity and PPV of PD brushings were lower (85.71% vs. 93.75%, NS and 86.67% vs. 93.75%, NS, respectively).

When either routine cytology results were positive or atypia was observed or FISH results were positive, the sensitivity was higher both in comparison with cytology (85.37% vs. 35.87%,  $p < 0.000$  for atypia as a negative result and 85.37% vs. 52.17%,  $p < 0.000$  for atypia as a positive result) and FISH (85.37% vs. 65.12%,  $p < 0.028$ ). Specificity was lower than that of cytology (86.96% vs. 100%,  $p < 0.022$ ) and FISH (86.96% vs. 87.5%, NS). PPV was lower than that of cytology (92.11% vs. 100%, NS) and higher than that of FISH (92.11% vs. 90.32%, NS), and NPV was higher than that of cytology and FISH (76.92% vs. 48.7% and 58.33% respectively, NS). Sensitivity and NPV of PD brushings were higher in comparison with BD brushings (93.75% vs. 80%, NS and 91.67% vs. 64.29%, NS, respectively) while specificity and PPV were lower (84.61% vs. 90%, NS and 88.24% vs. 95.24%, NS, respectively).

The clinical role of pancreatic juice cytology in the differential diagnosis of PD strictures is limited. Endoscopic brushings are a valuable diagnostic tool in case of PD strictures. Brush cytology of PD strictures is characterized by low sensitivity, but very high specificity and PPV and fairly high NPV. Sensitivity and NPV of brush cytology from PD strictures is higher in comparison with that of BD strictures. Fluorescence *in situ* hybridization of PD brushings is characterized by moderate sensitivity and NPV with fairly high specificity and PPV. PD brushings provide as good samples for FISH technique, as BD brushing. They are characterized by higher sensitivity and NPV, with slightly lower specificity and PPV than BD brushings. FISH has higher sensitivity, but lower specificity than routine cytology in the diagnosis of PD strictures. The best diagnostic result can be reached by combining those two methods. Interpretation of atypia as a positive cytological result increases sensitivity significantly, with unchanged high specificity.

## 11. ZAŁĄCZNIK

### Protokół FISH na utrwalonych preparatach z zastosowaniem sondy *UroVysion*

Data opracowania 19.11.2008

#### I. Przygotowanie preparatu

Numer badanego preparatu

1. .... 2. .... 3. .... 4. ....

1. Utrwalić preparat w utrwalaczu 3:1 przez 10 minut .....
2. Obejrzeć po mikroskopem, zaznaczyć na preparacie miejsce hybrydyzacji ołówkiem diamentowym .....

#### II Postępowanie przedhybrydyzacyjne

*Tech..... Data..... Godzina.....*

1. Inkubować preparaty w 2 x SSC (temp. 37°C) przez 15 min.....
2. Inkubować preparaty w *Protease Solution* przez 15 min (temp. 37°C) .....
3. Płukać preparaty w 1 x PBS 2 x 5 min w każdym 1. .... 2. ....
4. Utrwalić preparaty w 1% formaldehydzie (temp. pok.) przez 5 min. ....
5. Płukać preparaty w 1 x PBS 2 x 5 min w każdym 1. .... 2. ....
6. Odwodnić przez 2 min w 70% EtOH..... 80% EtOH..... 96% EtOH.....  
Wysuszyć .....

7. Ogrzać sondę (temp. pok.) przez 5 min ....., zworteksować i zwirować .....
8. Nałożyć sondę ....., przykryć szkiełkiem nakrywkowym ....., zakleić klejem.....
9. Kodenaturacja sondy i preparatu w temp. 73 °C przez 5 minut .....
10. Hybrydyzować w wilgotnej komorze (temp. 37°C) przez noc.....  
Rozpoczęcie inkubacji, godzina .....

### **III Postępowanie pohybrydyzacyjne**

Tech..... Data..... Godzina.....

1. Zatrzymać hybrydyzację, godzina ..... Usunąć klej, zdjąć szkiełko nakrywkowe .....
2. Płukać w 0,4 x SSC/0,3% NP-40 (temp. 73°C) przez 2 min .....
3. Płukać w 2 x SSC/0,1% NP-40 (temp. pok.) przez 1 min .....
4. Nałożyć 7ul *Vectashield DAPI* ....., przykryć szkiełkiem nakrywkowym ....., przechowywać (temp. 4°C) w ciemności.....
5. Zakończenie badanie, godzina .....