

WSTĘP

Podścielisko łącznotkankowo-naczyniowe jest istotną częścią guza nowotworowego, stanowiące jego zrąb, przez który przekazywane są składniki odżywcze proliferującym, komórkom nowotworowym. To właśnie dzięki elementom podścieliska, guz nowotworowy zachowuje swoją integralność i ma możliwość destrukcyjnego wzrostu „pasożytując” na organizmie gospodarza. W ostatnich latach dzięki szybkiemu rozwojowi biologii molekularnej i genetyki udowodniono, że populacja komórek nowotworowych z ich zdolnością do niepoohamowanej proliferacji powstaje na skutek akumulacji nieletalnych mutacji, do jakich dochodzi w przebiegu życia osobniczego (Jackson 1998, Loeb 2003). W toku badań okazało się także, że nowotwory są pod tym względem niezwykle zróżnicowaną grupą zmian patologicznych, a sam proces karcynogenezy jest złożony i wieloetapowy .

Nie inaczej jest w sporadycznym raku przewodowym trzustki, gdzie najistotniejsze mutacje dotyczą onkogenu K-ras (80-90% przypadków) i genów supresorowych: p16 (95%), SMAD4/ DPC4 (55%) oraz p53 (50-70%), a także w późniejszym okresie BRCA2 (Hahn 1996, Hruban 2000, Bardeesy 2002, Talar-Wojnarowska 2006). Akumulacje powyższych mutacji, korelują ze zmianami wewnątrzprzewodowymi nabłonka, co zaowocowało powstaniem klasyfikacji histopatologicznej zmian wewnątrzprzewodowych w trzustce (*pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN*) (Hruban 2000). W związku z faktem, że patogeneza nowotworów jest złożona, idea celowanej terapii przeciwnowotworowej, hamującej konkretną ścieżkę działania czynnika wzrostu, została jak do tej pory zrealizowana tylko w nielicznych nowotworach. Dobrym przykładem takiego działania leku, jest terapia imatinibem guzów podścieliskowych przewodu pokarmowego (Demetri 2002).

Powyższe rozważania, skłoniły badaczy do poszukiwania wspólnych cech dla różnych typów nowotworów i potencjalnych punktów uchwytu dla różnego rodzaju terapii. Stąd, w

naturalny sposób wpływa zainteresowanie podścieliskiem nowotworowym, stanowiącym delikatną sieć proliferujących naczyń krwionośnych, migrujących fibroblastów i komórek wysięku zapalnego, poddawanych działaniu cytokin.

Proces formowania podścieliska nowotworowego czyli stromatogenezy (Sivridis 2004) jest integralnie związany z tworzeniem sieci nowych naczyń krwionośnych czyli z angiogenezą (Folkman 1995, Risau 1997). W tworzeniu aktywnych biologicznie związków odpowiedzialnych za wzajemne relacje pomiędzy elementami strukturalnymi zrębu, biorą udział zarówno komórki nacieku zapalnego, z główną rolą makrofagów i komórek tłuszcznych, fibroblasty, jak i komórki nowotworowe. Do najważniejszych aktywnych biologicznie związków biorących udział w tworzeniu podścieliska należą czynniki wzrostu, takie jak: płytkowy czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor, PDGF*), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor, bFGF*), transformujący czynnik wzrostu beta (*transforming growth factor, TGF β*), czynnik martwicy guza (*tumor necrosis factor, TNF*) oraz szereg interleukin. Powyższe czynniki biologiczne wpływają zarówno na proliferację fibroblastów, komórek śródbłonna, jak również działają jako czynniki chemotaktyczne dla komórek nacieku zapalnego i umożliwiają skuteczne wytwarzanie istotnych elementów strukturalnych macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix, ECM*), z siecią białek o budowie włóknikowej (kolagen, laminina, elastyna), ściśliwych żeli zapewniających sprężystość tkanki (proteoglikany, kwas hialuronowy) powiązanych misterną siecią glikoprotein adhezyjnych i integryn. Te ostatnie, wraz z rodziną metaloproteinaz, aktywatorów plazminogenu, trombospondyną i mieszaniną kolagenaz, są odpowiedzialne za rozluźnienie elementów strukturalnych zrębu i tworzenie miejsca dla nowopowstałych, pączkujących naczyń krwionośnych (Kumar 2005).

Tworzenie podścieliska nie jest oczywiście procesem charakterystycznym wyłącznie dla wzrostu guza nowotworowego. Zjawisko to odgrywa nie mniej istotną rolę w przebiegu

przewlekłego zapalenia, doprowadzając w wielu przypadkach do powstawania mas patologicznych, które w praktyce klinicznej mogą budzić podejrzenie zmian nowotworowych. Przykładem narządu, w obrębie którego może dochodzić do nasilonej stromatogenezy w przebiegu obu tych procesów, jest trzustka.

Patogeneza zapalenia trzustki jest zbliżona w stanach ostrych (*pancreatitis acuta*) i w procesie przewlekłym (*pancreatitis chronica*). Zmiany morfologiczne w ostrym zapaleniu, takie jak: martwica tkanki gruczołowej trzustki oraz martwica enzymatyczna tkanki tłuszczowej, w połączeniu z aktywnym naciekiem zapalnym oraz destrukcją naczyń krwionośnych z towarzyszącymi wylewami krwi, wskazują na gwałtowne uszkodzenie tkanki trzustkowej w toku samotrawienia, na skutek patologicznej aktywacji enzymów trzustkowych. Mechanizmem inicjującym kaskadę wzajemnie pobudzających się proenzymów i enzymów, jest aktywacja tripsynogenu, który po przekształceniu w tripsynę ma zdolność aktywacji profosfolipazy i proelastazy (Marshall 1993). Obecnie postuluje się trzy najbardziej prawdopodobne patomechanizmy aktywacji enzymów trzustkowych:

- (i) w wyniku niedrożności przewodów trzustkowych dochodzi do retencji bogatego w enzymy płynu w tkance śródmiąższowej narządu, z istotną rolą lipazy (wydzielanej od razu w postaci aktywnej) doprowadzającej do martwicy enzymatycznej tkanki tłuszczowej, z pobudzeniem leukocytów i komórek o charakterze fibroblasta do wytwarzania szeregu cytokin (*interleukiny*, *TNF*, *substancja P*, *PAF*), które dalej wzmacniają odczyn zapalny i powodują zwiększoną przepuszczalność łoża naczyniowego (Kingsnorth 1997, Norman 1998),
- (ii) pierwotne uszkodzenie komórek zrazików trzustkowych, najczęściej w wyniku infekcji wirusowych, działania toksyn, uszkodzenia mechanicznego lub w przebiegu ostrego niedokrwienia (np. we wstrząsie),

(iii) w wyniku defektu w transporcie wewnątrzkomórkowym proenzymów w komórkach zrazików trzustkowych (Whitcomb 1999).

Omawiając patomechanizm ostrego zapalenia trzustki, nie można pominąć wpływu głównego metabolicznego czynnika rozwoju tej choroby, jakim jest nadużywanie alkoholu. Obecnie uważa się, że nadużywanie alkoholu doprowadza do powstawania nierozpuszczalnych, bogatobiałkowych złogów w świetle przewodników trzustkowych, co uruchamia kaskadowy mechanizm uszkodzenia trzustki opisany powyżej. Część autorów uważa, że ostre zapalenie trzustki jest w rzeczywistości zaostrzeniem procesu przewlekłego, manifestującego się po raz pierwszy w tak gwałtowny sposób (Pitchumoni 1996). Potwierdzeniem powyższej tezy może być fakt, że nadużywanie alkoholu pozostaje także głównym czynnikiem rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki, a podstawowy patomechanizm związany z powstawaniem nierozpuszczalnych konkrementów w przewodnikach trzustkowych, jest taki sam jak w ostrym zapaleniu trzustki (Suda 1990). Dodatkowo alkohol powoduje bezpośrednio, toksyczne uszkodzenie komórek części zewnątrzwydzielniczej trzustki, z ich stłuszczeniem i postępującą destrukcją, inicjującą proces włóknienia (Klößel 1999). Patomechanizm toksycznego działania alkoholu, jak również innych czynników toksycznych, jest związany ze stresem oksydacyjnym i działaniem wolnych rodników niszczących komórki zrazików trzustkowych (Adler 1997). W efekcie zostaje uwolnionych szereg cytokin, takich jak IL-8 (*interleukina 8*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant-1*), TGF- β (*transforming growth factor – β*) (Saurer 2000). Ten ostatni czynnik wpływa na aktywność trzustkowych komórek gwiaździstych (*pancreatic stellate cells, PSC*), które odgrywają kluczową rolę w patogenezie włóknienia trzustki (Omary 2007).

Uwzględniając powyższe dane, rodzi się pytanie, jaką rolę w patogenezie raka trzustki odgrywa przewlekłe zapalenie tego narządu. Przez długi czas nie udawało się ustalić, jakie jest ryzyko rozwoju raka u pacjentów cierpiących na przewlekłe zapalenie trzustki.

Czynnikiem utrudniającym analizę tych relacji jest fakt, że rozwój guza nowotworowego, może wtórnie doprowadzać do zmian zapalnych poprzez zamykanie światła przewodników trzustkowych. Ponadto obserwacja odpowiednio dużej populacji pacjentów cierpiących na przewlekłe alkoholowe zapalenie trzustki przez kolejne 20-30 lat jest utrudniona, ze względu na wyniszczający tryb życia jaki prowadzą. Niemniej jednak Malka i wsp. (2002) ustalili przeprowadzając badania prospektywne nad populacją 373 pacjentów, że ryzyko wystąpienia raka trzustki u osób cierpiących na przewlekłe zapalenie trzustki, jest 27 - krotnie większe niż w populacji nie obciążonej tym schorzeniem. U osób z wrodzonym zapaleniem trzustki spowodowanym mutacją w genie PRSS1 (*cationic trypsinogen gene*) stwierdzono 53 – krotny wzrost zapadalności na przewodowego raka trzustki (Lowenfels 1997). Z kolei mutacje w genie SPINK1 (*secretory trypsin inhibitor gene*) doprowadzają do 100 – krotnego wzrostu ryzyka rozwoju raka, z występowaniem pierwszych objawów około 14 lat wcześniej niż w raku sporadycznym. Istnieje także powiązanie pomiędzy przewlekłym zapaleniem trzustki i rakiem trzustki, u osób cierpiących na zwłóknienie torbielowate (cystic fibrosis). Pacjenci ci, obarczeni mutacją w genie CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductans regulator gene*) z powodu upośledzenia sekrecji enzymów trzustkowych i związanej z tym tendencji do przewlekłego zapalenia, są także w większym stopniu narażeni na ryzyko rozwoju raka (McWilliams 2005). Istotnym dowodem wskazującym na przewlekłe zapalenie trzustki, jako czynnika ryzyka rozwoju raka trzustki, było doniesienie z 2003, w którym Andea i wsp. porównali częstość występowania zmian wewnątrzprzewodowych o charakterze PanIN w mięszu trzustek bez zmian zapalnych, z częstością tego typu zmian w przewlekłym zapaleniu trzustki. Zmiany o charakterze PanIN stwierdzono w 68% zapalnie zmienionych trzustek i zaledwie w 28% trzustek bez zmian zapalnych. A zatem, w jaki sposób przewlekłe zapalenie wpływa na wzrost ryzyka rozwoju raka trzustki?

Konkretne patomechanizmy nie są jeszcze w pełni poznane. Jedną z hipotez jest aktywacja jądrowego czynnika transkrypcji NFκB, do której może dochodzić w wyniku działania różnorodnych cytokin, z istotną rolą TNFα wydzielanego przez różne typy komórek nacieku zapalnego, między innymi przez makrofagi (Hayden 2004). Innym istotnym mediatorem odpowiedzialnym za karcynogenezę w trzustce może być COX-2 (*cyklooksygenaza-2*), odpowiedzialna za syntezę prostaglandyn i eikozanoidów, której wzrost aktywności stwierdzono w wielu nowotworach pochodzenia nabłonkowego, a także w przewlekłym zapaleniu trzustki, zmianach o charakterze PanIN oraz w większości raków przewodowych trzustki (Tucker 1999, Schlosser 2002, Albazaz 2005). Niezależnie od konkretnych patomechanizmów można stwierdzić, że przewlekłe zapalenie, poprzez promowanie miejscowego wydzielania cytokin, czynników wzrostu i wolnych rodników, doprowadza do szeregu zmian w mikrośrodkowisku chorego narządu, które sprzyjają akceleracji nabywania mutacji niezbędnych do powstania komórki o fenotypie raka. Jest to sytuacja podobna do tej, którą stwierdzono w relacji przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka i raka żołądka, lub przewlekłego zapalenia wątroby i raka wątrobowokomórkowego (Li 2007).

Wobec powyższych faktów nie dziwi duże zainteresowanie jakim cieszy się w ostatnich latach podścielisko nowotworowe. W badaniach nad istotą choroby nowotworowej przez długi czas nie doceniano faktu, że masę guza nowotworowego niekiedy w bardzo dużym odsetku stanowi właśnie podścielisko, które wydaje się różnić od podścieliska wytwarzanego w przebiegu przewlekłego zapalenia. Pojęcie mikrośrodkowiska (*microenvironment*) zdefiniowane jako populacja nienowotworowych komórek i ich zrębu w guzie nowotworowym, na stałe zagościło w pracach naukowych (Unger 2003, Kumar 2005). Obecnie uważa się, że nienowotworowe elementy podścieliska wpływają na podtrzymanie rozrostu komórek nowotworowych, na zdolność do tworzenia przerzutów, na nasilenie angiogenezy, a także potencjalnie same mogą stać się celem farmakoterapii (Li 2007).

W toku badań nad mikrośrodowiskiem, szczególne zainteresowanie wzbudza rola makrofagów w guzach nowotworowych (*tumor associated macrophages, TAM*) oraz komórek tucznych (*mast cells, MC*).

Wyniki prac badawczych na temat korelacji czasu przeżycia chorych na raka, z intensywnością nacieku makrofagów, są zróżnicowane w zależności od badanego narządu. Przeważają doniesienia o gorszym rokowaniu w guzach zawierających dużo makrofagów. W części prac stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy nasileniem angiogenezy, a ilością makrofagów np. w raku sutka, prostaty, endometrium, pęcherza moczowego (Leek 2002, Lissbrant 2000, Ohno 2004) lub pomiędzy ilością makrofagów, a ilością węzłów chłonnych zajętych przez przerzuty raka (rak sutka, pęcherza moczowego) (Tsutsui 2005, Hanada 2000). W toku badań wysunięto hipotezę, że populacja makrofagów w guzie nowotworowym nie jest jednorodna, a część z nich może ulegać nieprawidłowej stymulacji, przekształcając się z komórek prezentujących antygen i pobudzających układ immunologiczny do walki z rakiem, w komórki wydzielające czynniki zwiększające rozplam komórek nowotworowych oraz pobudzających angiogenezę w guzie nowotworowym (Mantovani 2002)

Równie zróżnicowane wyniki otrzymano badając wpływ komórek tucznych na biologiczną aktywność guza nowotworowego. W części doniesień podkreśla się dodatnią korelację pomiędzy gęstością nacieku mastocytów (*mast cell density, MCD*), a gęstością naczyniową (*microvessel density, MVD*) (Tuna 2006). Z kolei sprzeczne rezultaty pochodzą z badań nad wpływem mastocytów na złośliwość biologiczną raka żołądka; w 1999 Yano i wsp. stwierdzili zwiększenie gęstości naczyniowej w guzach bogatych w komórki tuczne oraz gorsze rokowanie u takich pacjentów, a w 2005 Liu i wsp. odnotowali zmniejszoną progresję raka żołądka w guzach bogatych w mastocyty, zlokalizowanych głównie we froncie nacieku nowotworowego. Jeżeli chodzi o porównawczą analizę dystrybucji i roli komórek tucznych w raku trzustki i przewlekłym zapaleniu trzustki, to istnieją pojedyncze doniesienia na ten temat.

Zarówno w raku trzustki jak i przewlekłym zapaleniu trzustki stwierdzono zdecydowanie większą ilość komórek tucznych w stosunku do grupy kontrolnej. Jednocześnie podkreśla się związek ilości komórek tucznych w podścielisku raka trzustki z nasileniem angiogenezy oraz ilością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (Esposito 2004, 2002).

Kolejnym tematem budzącym kontrowersje w odniesieniu do podścieliska nowotworowego jest dystrybucja komórek ASMA+ (*alfa smooth muscle actin*) oraz CD34+. Istnieje szereg doniesień postulujących „zanikanie” komórek CD34+ w podścielisku zmian złośliwych oraz nasilenie ekspresji komórek ASMA+, czyli komórek o charakterze miofibroblasta. Do tej pory większość doniesień koncentrowała się na ocenie podścieliska zmian w gruczole piersiowym (Chauhan 2003, Yazhou 2004, Kuroda 2005) i w raku jelita grubego (Nakayama 2000, Kuroda 2005). W przypadku trzustki udowodnienie tego typu dystrybucji komórek w podścielisku nowotworowym mogłoby mieć szczególne znaczenie, jako dodatkowe narzędzie w histopatologicznej diagnostyce różnicowej przewlekłego zapalenia i raka przewodowego trzustki, zwłaszcza przy ocenie materiału z oligobiopsji. Jak do tej pory w światowym piśmiennictwie można znaleźć jedynie dwie prace na temat dystrybucji komórek CD34+ w podścielisku zmian patologicznych trzustki. W 2002 Barth i wsp. porównał pod tym kątem grupę 12 raków przewodowych, 8 przewlekłych zapaleń trzustki i 7 nowotworów endokrynnych, a Kuroda i wsp. (2004) objął badaniami bardzo zróżnicowaną grupę zmian patologicznych obejmującą guzy trzustki pochodzenia endokrynnego, raki przewodowe, torbielakogruczolakaki oraz kilka przypadków ostrych i przewlekłych zapaleń o różnej etiologii (razem 43 przypadki). W obu tych pracach wyniki wskazywały na różnice w dystrybucji komórek CD34+ w zmianach złośliwych i łagodnych, ale badane grupy były stosunkowo nieliczne. W przypadku trzustki, dodatkową wartością wynikającą z oceny dystrybucji komórek ASMA+ w różnych zmianach patologicznych, jest odniesienie do aktywności komórek gwiaździstych (*stellate cells*), dzięki którym trzustka

posiada tak niezwykłą zdolność do tworzenia podścieliska. Do tej pory pojawiły się tylko pojedyncze doniesienia porównujące różnice w dystrybucji aktywowanych komórek gwiaździstych w podścielisku zmian nowotworowych i zapalnych trzustki (Omary 2007).

Pomimo dużej liczby doniesień na temat natury podścieliska nowotworowego, jak do tej pory ukazało się stosunkowo niewiele prac porównujących je do podścieliska w zmianach zapalnych. Uchwycenie tych różnic, może być pomocne w zrozumieniu patomechanizmów tworzenia i funkcjonowania podścieliska w zmianach o różnej etiologii, a także może dać podstawy do sformułowania nowych wykładników morfologicznych, które mogą stać się dodatkowym narzędziem w diagnostyce różnicowej zmian zapalnych i nowotworowych. Badania nad podścieliskiem mogą dać także odpowiedź, w jaki sposób kształtowana jest złośliwość biologiczna nowotworu oraz wyznaczyć nowe kierunki w poszukiwaniu punktów uchwytu dla nowych leków przeciwnowotworowych.

CELE PRACY

1. Porównawcza ocena morfologiczna podścieliska w przewlekłym zapaleniu i raku trzustki z uwzględnieniem:

- a. dystrybucji komórek CD34+ oraz ASMA+
- b. ilości makrofagów i komórek tucznych
- c. gęstości naczyniowej mikrokrażenia

2. Ustalenie wartości diagnostycznej części powyższych parametrów w histopatologicznej diagnostyce różnicowej raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki.

MATERIAŁ I METODY

Material i opis badanej grupy

Badania przeprowadzono wykorzystując materiał archiwalny Katedry i Zakładu Patomorfologii AMG z lat 1998-2005 obejmujący raki trzustki i przewlekłe zapalenia trzustki. Tylko jeden przypadek raka pochodził z okresu wcześniejszego (1989). Do badań zakwalifikowano pierwotne, gruczołowe raki trzustki wywodzące się z przewodów trzustkowych (*adenocarcinoma ductale pancreatis*). Z badanej grupy wyłączono gruczolakoraki torbielowate typu „jajnikowego”, nowotwory wywodzące się z wysp trzustkowych, nowotwory pochodzenia mezenchymalnego oraz stosunkowo nieliczne przypadki przerzutów innych nowotworów do mięszu trzustki.

Przypadki przewlekłego zapalenia trzustki także pochodziły z materiału pooperacyjnego pacjentów, u których w przebiegu procesu zapalnego doszło do powstania wyraźnej zmiany guzowatej. Z badanej grupy wyłączono przypadki ostrego zapalenia z rozległą martwicą lub zmianami ropnymi, a także przypadki pochodzące z obszarów graniczących z pseudotorbielami.

Grupę kontrolną stanowiły fragmenty mięszu trzustek o prawidłowej budowie makro- i mikroskopowej, pochodzące ze zwłok osób zmarłych z innych przyczyn, nie obciążonych wywiadem alkoholowym, które za życia nie prezentowały jakichkolwiek dolegliwości sugerujących chorobę trzustki. Dodatkowym kryterium pozwalającym na włączenie wycinka do grupy kontrolnej było dobre zachowanie materiału bez zmian autolitycznych.

W celu wykonania analizy porównawczej uzyskany materiał podzielono na trzy grupy:

I grupa – pierwotne gruczolakoraki przewodowe trzustki

II grupa – przewlekłe zapalenia trzustki

III grupa – trzustki o prawidłowej budowie histologicznej (grupa kontrolna).

Zabiegi operacyjne przeprowadzono w I i II Klinice Chirurgii Ogólnej Akademii Medycznej w Gdańsku.

W grupie raka trzustki znalazły się 62 przypadki, w tym 38 mężczyzn (61%) oraz 24 kobiety (39%) w wieku od 43 do 91 lat (średnia wieku 63,95 mediana 64).

43 preparaty pochodziły z resekcji metodą Whipple'a, 11 przypadków z resekcji oszczędzających odźwiernik, w 6 przypadkach dokonano całkowitej pankreatektomii, a 2 preparaty pochodziły z resekcji dystalnych części trzustki.

Stadium zaawansowania choroby nowotworowej (pTNM) oceniano w oparciu o skalę TNM (Sobin & Wittekind, 6th edition, 2002), wykorzystując dane z zachowanych raportów histopatologicznych materiału pooperacyjnego. Zaawansowanie choroby nowotworowej w badanej grupie przedstawiało się następująco:

- cecha pT: pT1- 2 przypadki (3%), pT2- 21 przypadków (33%), pT3- 36 przypadków (58%), pTx- 3 przypadki (4%)
- cecha pN: pN0- 29 przypadków (46%), pN1- 30 przypadków (48%), pNx – 3 przypadki (4%)
- cecha M: w oparciu o raporty histopatologiczne znaleziono tylko 3 przypadki z udokumentowanymi w nich przerzutami odległymi (4%).

W grupie przewlekłego zapalenia trzustki znalazły się 43 przypadki, w tym 32 mężczyzn (74%) oraz 11 kobiet (26%) w wieku od 19 do 81 lat (średnia wieku 48,76 mediana 47). W 16 przypadkach dokonano resekcji metodą Whipple'a, w 17 przypadkach preparaty

pochodziły z zabiegów oszczędzających odźwiernik, w 10 przypadkach usunięto same fragmenty mięszu trzustki.

Dokonano przeglądu preparatów histopatologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną (H-E), wybierając wycinki spełniające następujące kryteria:

- a. wycinek ukazujący reprezentatywny obraz histopatologiczny dla danego rozpoznania
- b. wycinek pozbawiony nasilonych zmian martwiczych, aktywnego, ropnego wysięku zapalnego, zawierający dobrze zachowany, nie skoagulowany materiał tkankowy
- c. wycinek zawierający wystarczającą do oceny ilość podścieliska.
- d. w przypadku grupy kontrolnej selekcjonowano wycinki zawierające zdrowy mięsz trzustki bez cech autolizy.

Do wyselekcjonowanych preparatów dopasowano odpowiednie bloki parafinowe zawierające materiał tkankowy opracowany według rutynowej procedury (utrwalenie w 4% formalinie maksymalnie przez 72 godziny, pobranie reprezentatywnych wycinków, następnie ich odwodnienie poprzez przeprowadzenie przez odpowiednie stężenia alkoholu etylowego i ksylenu i zatopienie w parafinie niskotopliwej). Z bloków parafinowych krojono skrawki grubości 4 μ m do wykonania barwień specjalnych.

Barwienia specjalne i metody ich oceny

Wykonano następujące odczyny immunohistochemiczne oraz histochemiczne:

1. Barwienie metodą Giemsy (wg. rutynowej procedury)
2. Przeciwciała przeciw aktynie mięśni gładkich (*alpha smooth muscle actin, ASMA*) (klon 1A4, Dako Cytomation)
3. Przeciwciała przeciw antygenowi CD34 (klon B1-C5, Dako Cytomation)
4. Przeciwciała przeciw antygenowi CD31 (klon JC70A, Dako Cytomation)
5. Przeciwciała przeciw wspólnemu antygenowi leukocytów (*leucocyte common antigen, LCA*) (klon 2B11+PD7/26, Dako Cytomation)
6. Przeciwciała przeciw antygenowi CD68 (klon KP1, Dako Cytomation)

Antygeny odkrywano podgrzewając skrawki w temperaturze 95°C przez 20 minut w buforze cytrynianowym. Obecność kompleksów antygen-przeciwciało uwidaczniano przy użyciu biotynylowanych przeciwciał wtórnych oraz kompleksu streptawidyna-peroksydaza (system LSAB, K675, DAKO). Jako chromogenu użyto diaminobenzyny (DAB). Kontrolę negatywną wykonano stosując powyższą procedurę, nakładając w miejsce przeciwciał pierwotnych roztwór surowicy mysiej od nieimmunizowanego zwierzęcia. Szczegółowy opis procedury wykonywanych odczynów znajduje się w Dodatku.

W preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną (H-E) dokonano półilościowej oceny nasilenia stromatogenezy oceniając, jaki obszar w preparacie zajmuje podścielisko, wg następujących kryteriów:

0 – brak nasilonej stromatogenezy (norma)

1+ – małe nasilenie (poniżej 25% pola powierzchni badanego skrawka)

2+ – średnie nasilenie (25% - 50% pola powierzchni badanego skrawka)

3+ – duże nasilenie (powyżej 50% pola powierzchni badanego skrawka)

Na tym etapie nie analizowano jeszcze, czy podścielisko jest mniej lub bardziej zwłókniałe, ani nie oceniano czy jest bogato- lub ubogokomórkowe. Dodatkowo przy ocenie podścieliska zmian zapalnych oceniono nasilenie włóknienia około- i śródzrazikowego (*interacinar fibrosis, intraacinar fibrosis*) także według skali trójstopniowej:

1 – małe nasilenie

2 – średnie nasilenie

3 – duże nasilenie

A zatem przykładowy zapis tabelaryczny włóknienia w przewlekłym zapaleniu trzustki: nasilenie włóknienia 3, inter 3, intra 2 oznacza: duże nasilenie stromatogenezy (powyżej 50% pola powierzchni badanego skrawka), z dużym nasileniem włóknienia międzyczrazikowego i średnio wyrażonym włóknieniem śródzrazikowym. Z kolei zapis: włóknienie 3, inter 2, intra 2 oznacza: duże nasilenie włóknienia (powyżej 50% objętości pola powierzchni badanego skrawka), ale jest rozłożone równomiernie pomiędzy obszary międzyczrazikowe i śródzrazikowe (tab. na str. 73)

Ponadto zanotowano skłonność do włóknienia i szkliwienia podścieliska w centralnych częściach obszarów o wzmożonej stromatogenezie, odnotowując ją jako:

0 – brak obszarów nasilonego bliznowacenia i szkliwienia

1 – są obszary nasilonego bliznowacenia i szkliwienia

Kolejnym etapem była ocena ekspresji komórek ASMA+ w podścielisku. Także w tym wypadku dokonano oceny półilościowej, modyfikując metodę oceny opisaną przez Kurodę w odniesieniu do podścieliska gruczołu piersiowego w 2005. W oryginalnej pracy dokonywano oceny wg. następujących kryteriów: (-) brak ekspresji, (+/-) pojedyncze komórki, (+) reakcja ogniskowa, (++) reakcja średnionasilona, wielogniskowa, (+++) reakcja silna, rozlana.

Modyfikując powyższą skalę w celu oceny zmian w trzustce, także wzięto pod uwagę ilość komórek podścieliska wykazujących pozytywną reakcję, a ponadto specyficzną dla trzustki dystrybucję. W ten sposób powstała poniższa skala:

0 – brak reakcji

1+ – reakcja słabo/średnio zaznaczona ogniskowo (w przypadku zmian zapalnych głównie około- i śródzrazikowo)

2+ – reakcja wyraźnie zaznaczona ogniskowo (w przypadku zmian zapalnych głównie około i śródzrazikowo)

3+ – reakcja średnio zaznaczona, rozlana

4+ – reakcja wyraźnie zaznaczona, rozlana.

Dodatkowo za wewnętrzną kontrolę poprawności wykonania odczynu immunohistochemicznego, posłużyła reakcja z warstwą mięśniową dużych naczyń i struktur przewodowych w trzustce.

Powyższą skalę zastosowano także w celu oceny dystrybucji komórek CD34+ w podścielisku. Pod uwagę brano tylko reakcję z komórkami podścieliska o wrzecionowatych kształtach (Barth 2002). Z reguły odróżnienie komórek podścieliskowych CD34+ od komórek pochodzenia endotelialnego nie sprawiało trudności, ale w części przypadków wątpliwości rozwiewało barwienie z CD31 (jeżeli reakcja z CD31 także wypadła dodatnio w spornym obszarze, interpretowano komórki jako pochodzenia endotelialnego, jeżeli reakcja z CD31

wypadała ujemnie, komórki interpretowano jako komórki podścieliskowe CD34+). Przy wykonywaniu reakcji z CD34 wewnętrzną kontrolę poprawności wykonanego odczynu stanowiły śródbłonki naczyń.

Kolejnym odczynem interpretowanym półilościowo była reakcja z LCA. Zdecydowano się na półilościową ocenę intensywności limfatycznokomórkowego nacieku zapalnego, z uwagi na jego chaotyczne rozmieszczenie, zwłaszcza w grupie raków, z częstym tworzeniem odczynowych skupień i grudek chłonnych. Oceny dokonano na podstawie poniższej skali:

1+ – nieliczne limfocyty, rozproszone

2+ – umiarkowane nacieki zapalne, rozlane

3+ – umiarkowane nacieki zapalne, rozlane z tworzeniem skupień i grudek

4+ – obfite, nasilone, rozlane nacieki zapalne

Pozostałe trzy odczyny były oceniane metodą ilościową. Do oznaczenia naczyń mikrokrążenia użyto przeciwciał przeciw antygenowi CD31. Zrezygnowano z użycia przeciwciał przeciw antygenowi CD34 do oznaczania naczyń mikrokrążenia, z uwagi na liczne komórki podścieliskowe wykazujące dodatnią ekspresję tego markera w zmianach zapalnych, co może utrudniać liczenie struktur naczyniowych.

Wybór fragmentu do badań odbywał się w następujący sposób:

- a. pod małym powiększeniem (40x, 100x) lokalizowano w obrębie guza nowotworowego lub zapalnego obszary o największej ekspresji CD31
- b. według własnej, subiektywnej oceny typowano fragment o największej liczbie naczyń w polu widzenia (Weidner 1991)
- c. przy powiększeniu 200x zliczano naczynia w pięciu polach widzenia

- d. liczono tylko te struktury naczyniowe, które posiadały wyraźne światło uchwytnie pod powiększeniem 200x, pomijając wybarwione komórki podścieliska pozbawione światła lub te, które tworzyły trudne do oceny zagęszczenia komórkowe.

Wyniki pomiarów z pięciu kolejnych pól widzenia umieszczano w tabeli, wyciągając średnią arytmetyczną, jako wynik reprezentatywny dla danego przypadku.

Zbliżoną procedurę zastosowano w odniesieniu do odczynu immunohistochemicznego z antygenem CD68 (na obecność makrofagów) oraz preparatów barwionych klasyczną metodą Giemsy (na obecność komórek tucznych). Także w tych preparatach wyszukiwano ogniska zagęszczeń nacieku zapalnego („hot spots”), unikając typowych zagęszczeń komórek wysięku zapalnego występujących wokółnaczyniowo (Esposito 2004), a następnie liczono komórki w pięciu subiektywnie wybranych polach widzenia, ale pod powiększeniem x400. Uzyskane wyniki umieszczano w tabelach, wyciągając średnią arytmetyczną jako wynik reprezentatywny dla danego przypadku.

Analiza statystyczna

Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano testem *Smirnowa-Kolmogorowa*.

Różnice w rozkładach nasilenia stromatogenezy, ilości komórek ASMA+, CD34+ i LCA+ w badanych grupach weryfikowano testem *chi kwadrat*.

Różnice pomiędzy średnimi wartościami gęstości naczyniowej, liczby makrofagów i komórek tucznych w badanych grupach potwierdzano za pomocą *analizy wariancji* i testów *post-hoc Tukeya*.

Różnice pomiędzy rozkładem liczby komórek tucznych w badanych grupach sprawdzano za pomocą testu *Kruskala-Wallisa*.

Korelacje pomiędzy gęstością naczyń mikrokrażenia, a liczbą makrofagów i komórek tucznych w podścielisku, weryfikowano za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona.

Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica 5,0 (StatSoft Inc.; Tulsa USA).

WYNIKI

1. Badania histopatologiczne w barwieniu hematoksyliną i eozyną (H-E).

Oceniając nasilenie stromatogenezy w badanych grupach, stwierdzono znacznie większą ilość podścieliska zarówno w rakach, jak i guzach o etiologii zapalnej w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych trzustek. W grupie zapaleń w 39 przypadkach (90,7%) nasilenie stromatogenezy oceniono na 3+ (podścielisko zajmuje ponad 50% powierzchni badanego skrawka) lub 2+ (podścielisko zajmuje 25-50% powierzchni badanego skrawka), odpowiednio: 26 przypadków z nasileniem stromatogenezy 3+ (60,47%) oraz 13 przypadków z nasileniem stromatogenezy 2+ (30,23%). Ponadto w 4 przypadkach zapaleń oceniono nasilenie stromatogenezy na 1+ (9,3%).

W grupie raków w 55 przypadkach (88,71%) nasilenie stromatogenezy oceniono na 3+ lub 2+, odpowiednio: 23 przypadki z nasileniem stromatogenezy 3+ (37,10%) oraz 32 przypadki z nasileniem stromatogenezy 2+ (51,61%). W dalszych 7 przypadkach (11,29%) oceniono nasilenie stromatogenezy na 1+.

W grupie kontrolnej tylko w 2 przypadkach oceniono nasilenie stromatogenezy na 1+ (poniżej 25% objętości badanego skrawka), co stanowi 10% grupy, a w 18 przypadkach oceniono ilość podścieliska jako odpowiadającą normie dla trzustki (90%). Należy jednak zaznaczyć, że dwa przypadki z grupy kontrolnej, w których nasilenie stromatogenezy oceniono na 1+, oscyloowało ono zdecydowanie bliżej 1% powierzchni badanego skrawka niż 25%.

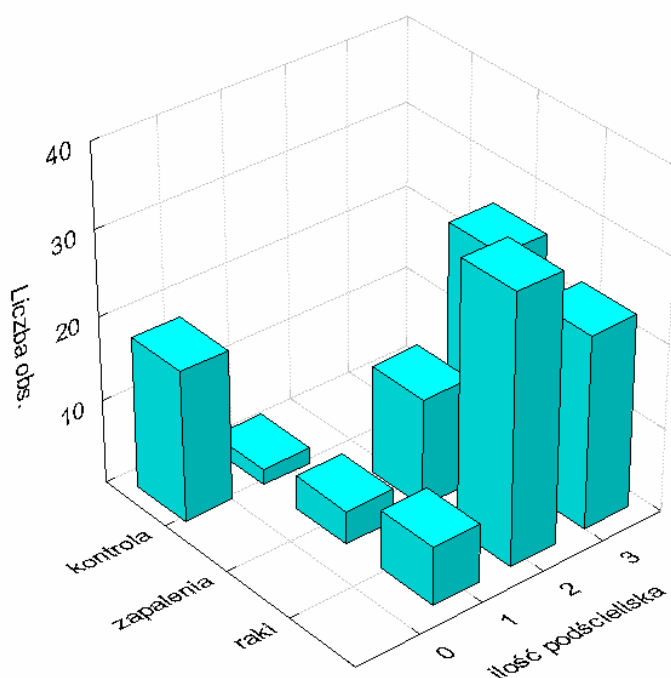
Stwierdzono znamienne statystycznie różnice w nasileniu stromatogenezy w grupie raków i zapaleń trzustki w porównaniu z grupą kontrolną (*różnice w rozkładzie znamienne statystycznie; $p < 0,001$ - test chi kwadrat*)

Nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy w nasileniu stromatogenezy pomiędzy grupą raków, a zapaleń trzustki ($p= 0,12$; test chi kwadrat)

Zestawienie powyższych danych przedstawia sumarycznie poniższa tabela:

Tab.1 Nasilenie stromatogenezy (ilość podścieliska)

	0	1+	2+	3+	4+
Raki	-	7 (11,29%)	32 (51,61%)	23 (37,1%)	55 (88,71%)
Zapalenia	-	4 (9,3%)	13 (30,23%)	26 (60,47%)	39 (90,7%)
Grupa kontrolna	18 (90%)	2 (10%)	-	-	-



Dodatkowym parametrem ocenianym w rutynowym barwieniu H-E była obecność obszarów szkliwienia i bliznowacenia (silnie skolagenizowana tkanka łączna) w centralnych częściach obszarów z nasiloną stromatogenezą. W grupie raków znaleziono 7 przypadków z powyższą cechą podścieliska w obrazie barwionym H+E (11%), a w 55 przypadkach takiej cechy nie stwierdzono (89%). W grupie zapaleń aż w 31 przypadkach (72%) zaobserwowano obszary szkliwienia i bliznowacenia podścieliska, a 12 przypadkach (28%) takiej tendencji

nie zaobserwowano (różnice w rozkładzie badanej cechy są znamienne statystycznie; $p < 0,001$; test chi kwadrat).

Tab.2

	Tendencja do włóknienia i szklwienia (1)	Brak tendencji do włóknienia i szklwienia (0)
Raki	7 (11,29%)	55 (88,7%)
Zapalenia	31 (72%)	12 (28%)

2. Barwienia specjalne

A. Różnice w dystrybucji komórek CD34+ oraz ASMA+ w podścielisku raka i zapalenia trzustki.

W 51 przypadkach raka (82,26%) nie stwierdzono ekspresji CD34 w komórkach podścieliska (ekspresja oceniona na 0). W 5 przypadkach raka (8,06%) oceniono ekspresję CD34 na 1+ (reakcja słabo/średnio zaznaczona ogniskowo), w 3 przypadkach (4,84%) na 2+ (reakcja wyraźnie zaznaczona ogniskowo) i w kolejnych 3 przypadkach (4,84%) na 3+ (reakcja średnio zaznaczona, rozłana). W żadnym z przypadków raka nie stwierdzono wyraźnej, rozlanej ekspresji CD34 w komórkach podścieliska.

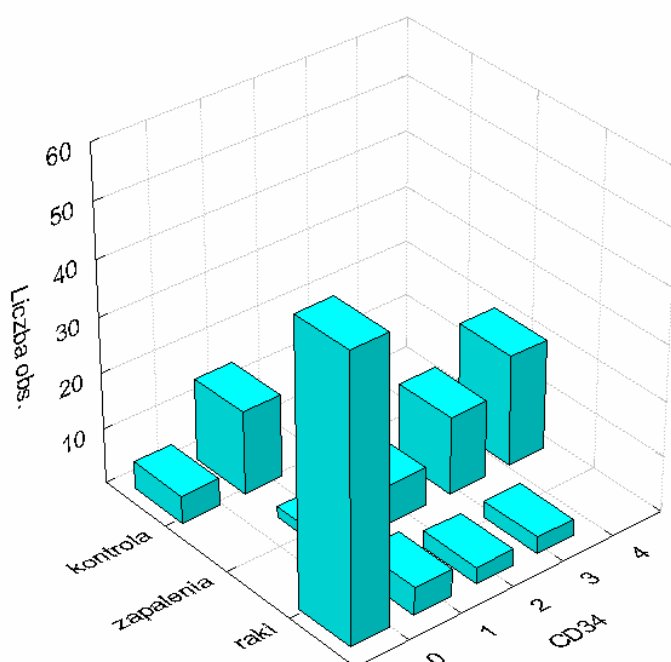
W grupie zapaleń trzustki w 20 przypadkach (46,51%) stwierdzono wyraźną, rozlaną ekspresję CD34 (ocenioną na 4+), w 14 przypadkach (32,56%), stwierdzono reakcję średnio zaznaczoną, rozlaną (ocenioną na 3+), w 7 przypadkach (16,28%) nasilenie ekspresji CD34 oceniono na 2+, a w 2 przypadkach (4,65%) ekspresję z CD34 oceniono na 1+. W żadnym z przypadków przewlekłego zapalenia trzustki nie stwierdzono całkowitego braku ekspresji CD34 w komórkach podścieliska.

W grupie kontrolnej w 5 przypadkach (25%) nie stwierdzono ekspresji CD34 w komórkach podścieliska, a w 15 przypadkach (75%) stwierdzono słabą ekspresję CD34 ocenioną na 1+.

Różnice w rozkładzie komórek CD34+ w poszczególnych grupach są znamienne statystycznie (*wartość $p < 0,001$ w teście chi kwadrat*).

Tab3. Dystrybucja komórek CD34+ w podścielisku

	0	1+	2+	3+	4+
Raki	51 (82,26%)	5 (8,06%)	3 (4,84%)	3 (4,84%)	-
Zapalenia	-	2 (4,65%)	7 (16,28%)	14 (32,56%)	20 (46,51%)
Grupa kontrolna	5 (25%)	15 (75%)	-	-	-



W grupie raków ekspresję ASMA w komórkach podścieliska oceniono na 4+ (wyraźna, rozlana ekspresja) w 44 przypadkach (70,97%), w kolejnych 17 przypadkach (27,42%) na 3+ (średnio zaznaczona, rozlana ekspresja) i w 1 przypadku (1,61%) oceniono na 2+ (reakcja wyraźnie zaznaczona, ogniskowo). Nie stwierdzono przypadków raka, w których reakcja komórek podścieliska z ASMA byłaby oznaczona na 0 lub 1+.

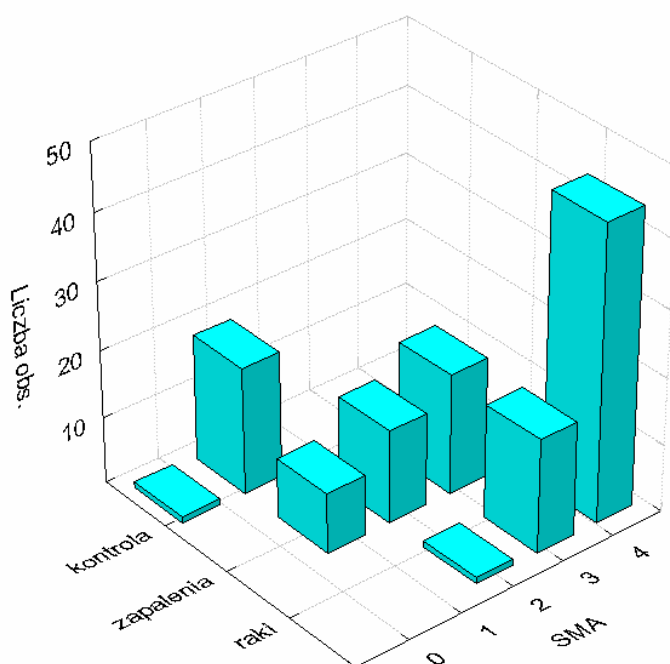
W grupie przewlekłych zapaleń trzustki ekspresję ASMA w komórkach podścieliska oceniono na 4+ w 2 przypadkach (4,65%), na 3+ w 18 przypadkach (41,86%), na 2+ w 14 przypadkach (32,56%), a na 1+ w 9 przypadkach (20,93%).

W grupie kontrolnej nie stwierdzono ekspresji komórek ASMA+ w podścielisku w 1 przypadku (5%), a słabą, ogniskową ekspresję stwierdzono w 19 przypadkach (95%).

Różnice w rozkładzie komórek ASMA+ w poszczególnych grupach są znamienne statystycznie (*wartość $p < 0,001$ w teście chi kwadrat*).

Tab.4 **Dystrybucja komórek ASMA+ w podścielisku**

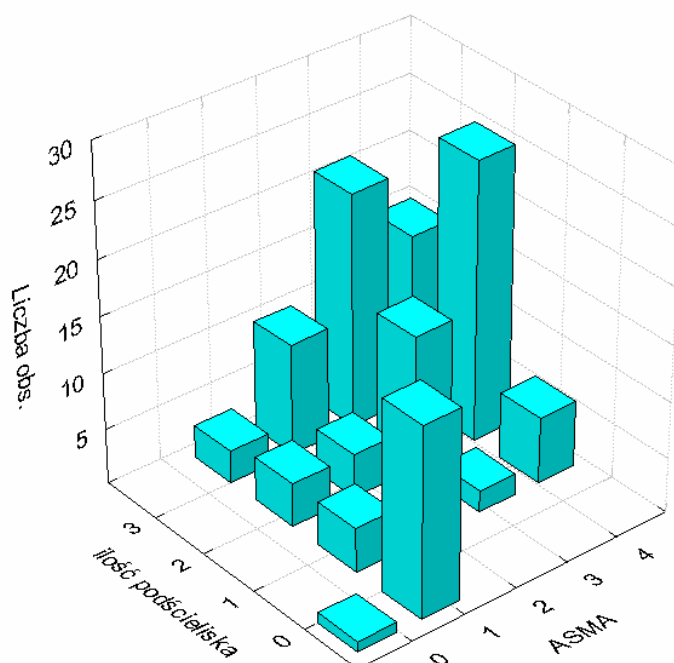
	0	1+	2+	3+	4+
Raki	-	-	1 (1,61%)	17 (27,42%)	44 (70,97%)
Zapalenia	-	9 (20,93%)	14 (32,56%)	18 (41,86%)	2 (4,65%)
Grupa kontrolna	1 (5%)	19 (95%)	-	-	-



Dodatkowo zbadano korelację pomiędzy nasileniem stromatogenezy (ocenianej ilościowo w barwieniu hematoksyliną i eozyną), a ekspresją komórek ASMA+ w podścielisku w obrębie trzech badanych grup. Wyniki przedstawia poniższa tabela:

Tab 5. Nasilenie stromatogenezy (ilość podścieliska)

	0	1+	2+	3+
ASMA 0	1 (0,8%)	-	-	-
ASMA 1+	17 (13,6%)	4 (3,2%)	4 (3,2%)	3 (2,4%)
ASMA 2+	-	1 (0,8%)	4 (3,2%)	10 (8%)
ASMA 3+	-	2 (1,6%)	12 (9,6%)	21 (16,8%)
ASMA 4+	-	6 (4,8%)	25 (20%)	15 (12%)



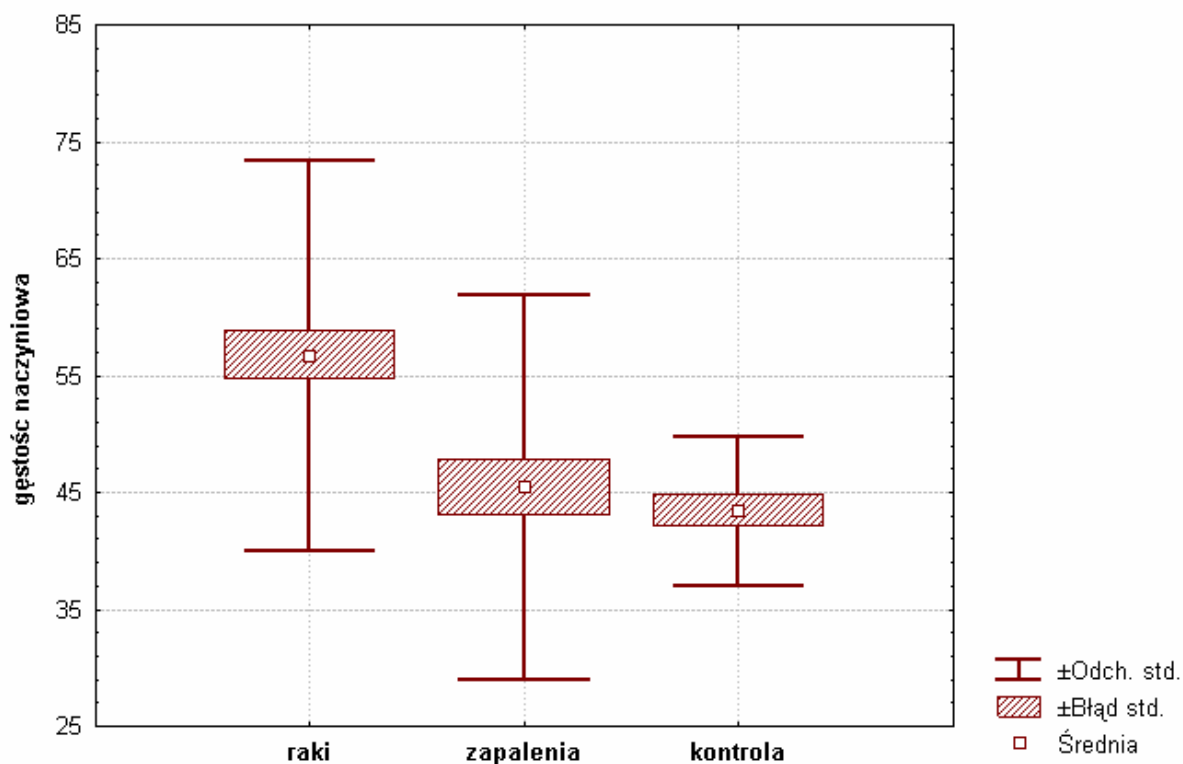
Różnice w rozkładach ocenianego parametru w badanych grupach są znamienne statystycznie ($p < 0,001$ w teście chi kwadrat) i wskazują na dodatnią korelację pomiędzy nasileniem stromatogenezy, a ilością komórek ASMA+ w podścielisku zmienionych chorobowo trzustek.

B. Różnice w unaczynieniu podścieliska w badanych grupach (jako markera użyto przeciwciała przeciw antygenowi CD31).

Stwierdzono następujące wartości średniej gęstości naczyniowej mikrokrążenia:
Średnia arytmetyczna ilość naczyń w podścielisku raka: 56,67 naczyń/pole widzenia (odchylenie standardowe: 16,69).
Średnia arytmetyczna ilość naczyń w podścielisku zmienionej zapalnie trzustki: 45,4 naczyń/pole widzenia (odchylenie standardowe: 16,42)
Średnia arytmetyczna ilość naczyń w podścielisku grupy kontrolnej: 43,37/pole widzenia (odchylenie standardowe 6,35)

Tab.6

	Średnia arytmetyczna unaczynienia (Ilość naczyń/pole widzenia)	Odchylenie standardowe
Raki	56,67	16,69
Zapalenia	45,4	16,42
Grupa kontrolna	43,37	6,35



Stwierdzono większą gęstość naczyniową w podścielisku raka trzustki w porównaniu z podścieliskiem przewlekłego zapalenia trzustki oraz większą gęstość naczyniową w podścielisku raka trzustki w porównaniu z podścieliskiem zdrowej trzustki (*wartości p odpowiednio: $p < 0,001$ i $p = 0,002$, analiza wariancji i testy post-hoc Tukeya*)

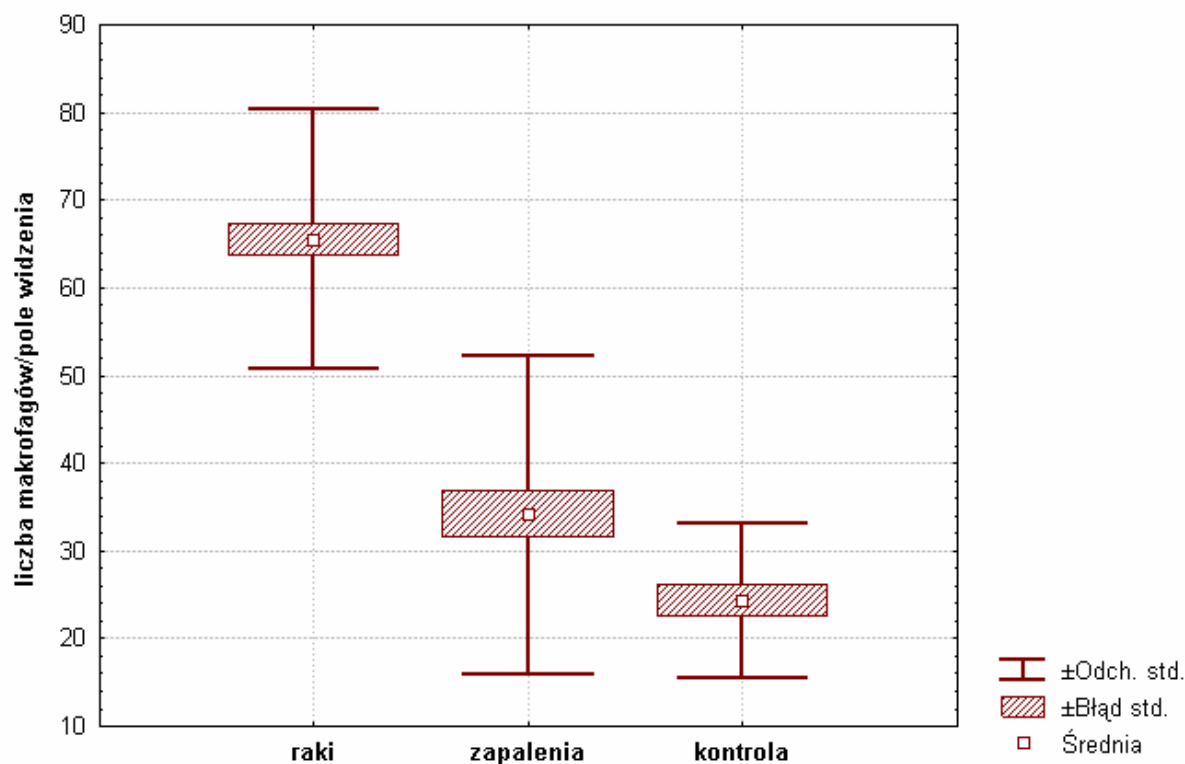
Różnica w gęstości naczyniowej podścieliska przewlekłego zapalenia trzustki i grupy kontrolnej nie jest znamienne statystycznie. (*$p = 0,87$, analiza wariancji i testy post-hoc Tukeya.*)

C. Różnice w dystrybucji makrofagów w podścielisku przewlekłego zapalenia i raka trzustki (jako markera użyto przeciwciała przeciw antygenowi CD68).

Stwierdzono znamienne statystycznie różnicę w średniej ilości makrofagów pomiędzy badanymi grupami. Średnia arytmetyczna ilość makrofagów w podścielisku raka: 65,54/pole widzenia (odchylenie standardowe: 14,87). Średnia arytmetyczna ilość makrofagów w podścielisku przewlekłego zapalenia: 34,13/pole widzenia (odchylenie standardowe: 18,16). Średnia arytmetyczna ilość makrofagów w podścielisku prawidłowej trzustki: 24,27 (odchylenie standardowe: 8,78).

Tab.7

	Średnia arytmetyczna ilości makrofagów (Ilość makrofagów/pole widzenia)	Odchylenie standardowe
Raki	65,54	14,87
Zapalenia	34,13	18,16
Grupa kontrolna	24,27	8,78



Różnice w średniej ilości makrofagów pomiędzy podścieliskiem raka i przewlekłego zapalenia trzustki oraz pomiędzy podścieliskiem raka i prawidłowej trzustki są znamienne statystycznie przy wartościach $p < 0,001$ (*analiza wariancji i testy post-hoc Tukeya*). Natomiast dla różnic w ilości makrofagów w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki i prawidłowego miąższu trzustki wartość $p = 0,046$ (*analiza wariancji i testy post-hoc Tukeya*.)

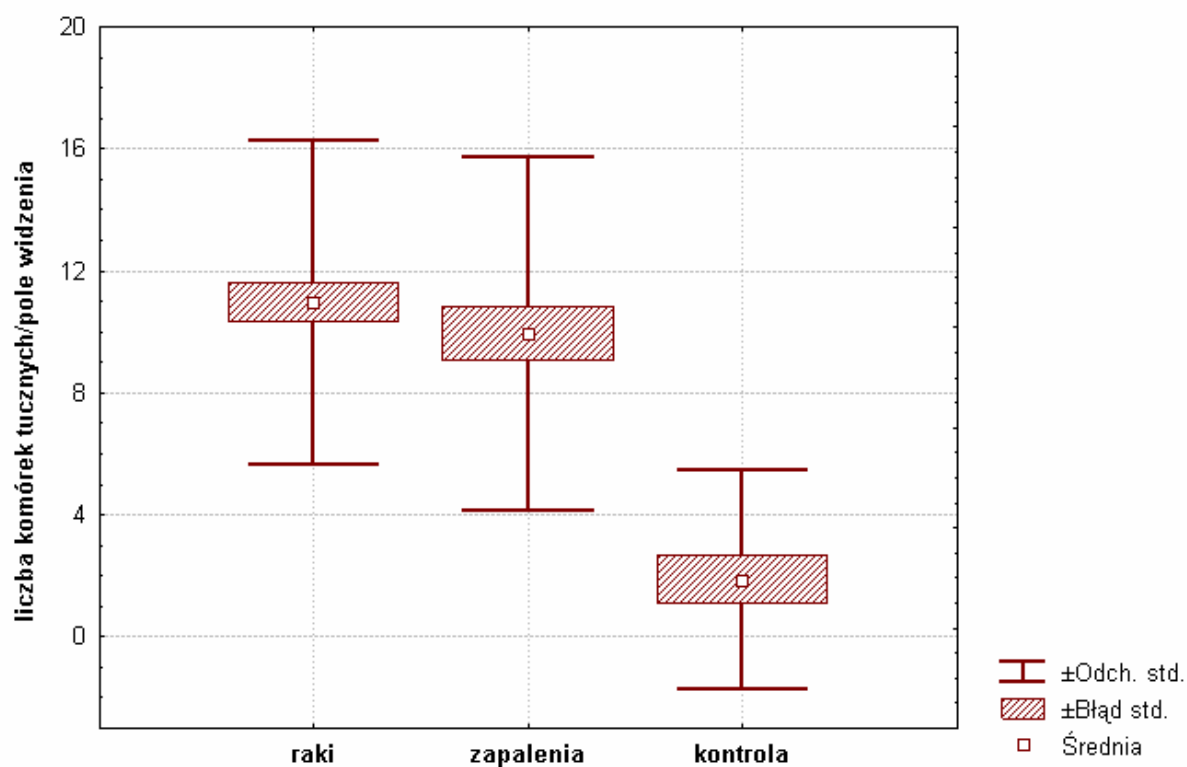
D. Różnice w dystrybucji komórek tucznych w podścielisku przewlekłego zapalenia i raka trzustki (komórki tuczne wybarwiono rutynową metodą Giemsy).

Stwierdzono różnicę w średniej ilości komórek tucznych pomiędzy badanymi grupami. Średnia arytmetyczna ilość komórek tucznych w podścielisku raka trzustki: 10,94/pole widzenia (odchylenie standardowe: 5,29). Średnia arytmetyczna ilość komórek tucznych w podścielisku przewlekłego zapalenia: 9,91/pole widzenia (odchylenie

standardowe: 5,77). Średnia arytmetyczna ilości komórek tucznych w podścielisku prawidłowej trzustki: 1,85 (odchylenie standardowe: 3,6).

Tab.8

	Średnia arytmetyczna ilości komórek tucznych (Ilość komórek tucznych/pole widzenia)	Odchylenie standardowe
Raki	10,94	5,29
Zapalenia	9,91	5,77
Grupa kontrolna	1,85	3,6



Stwierdzono większą ilość komórek tucznych w podścielisku raków i zmienionych zapalnie trzustek w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$, test Kruskala-Wallisa)

Dodatkowo zbadano korelacje pomiędzy:

- gęstością naczyniową w badanych grupach, a ilością makrofagów
- gęstością naczyniową w badanych grupach, a ilością komórek tłuszcznych.

Żadna z wyżej wymienionych zależności nie jest znamienne statystycznie: $p > 0,05$ (współczynnik korelacji liniowej Pearsona)

E. Różnice w dystrybucji nacieków limfatycznych w podścielisku przewlekłego zapalenia i raka trzustki (jako markera użyto przeciwciała przeciwko antygenowi LCA):

Nacieki limfatyczne były łatwo dostrzegalne zarówno w grupie zapaleń jak i raków trzustek. W grupie raków trzustek nacieki limfatyczne lokalizowały się głównie na froncie nacieku nowotworowego, a w części przypadków tworzyły bogatokomórkowe pasma nacieku zapalnego. Zestawienie dystrybucji limfocytów w poszczególnych grupach przedstawia poniższa tabela:

Tab.9 Dystrybucja komórek LCA+ w podścielisku

	0	1+	2+	3+	4+
Raki	-	2 (3,23%)	29 (46,77%)	29 (46,77%)	2 (3,23%)
Zapalenia	-	4 (9,3%)	14 (32,56%)	21 (48,84%)	4 (9,3%)
Grupa kontrolna	4 (20%)	14 (70%)	2 (10%)	-	-

Stwierdzona jedynie zwiększona ilość komórek LCA+ w podścielisku raka i zapalenia trzustki w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$, test chi kwadrat). Różnica w dystrybucji komórek LCA+ pomiędzy podścieliskiem raka i zmienionej zapalnie trzustki nie jest znamienne statystycznie ($p = 0,33$ (test chi kwadrat)).

DYSKUSJA

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat natury podścieliska w guzach nowotworowych. W toku badań dostrzeżono, że podścielisko nie jest jedynie biernym spoiwem dla komórek nowotworowych, ale bierze aktywny udział w kształtowaniu cech biologicznych nowotworu złośliwego, z jego zdolnością do inwazyjnego wzrostu i dawania przerzutów odległych. Nie mniej istotną rolę odgrywa podścielisko w przebiegu zmian zapalnych. Także tutaj skomplikowany układ wzajemnych oddziaływań może zaowocować powstaniem zmian guzowatych, które w praktyce klinicznej bywają trudne do odróżnienia od nowotworu. W obrębie trzustki zdolność do tworzenia dużej ilości zrębu w przebiegu różnych zmian chorobowych jest szczególnie wyraźna. Nie można nie doceniać faktu, że masę guza nowotworowego w tym narządzie mogą w większości tworzyć komórki podścieliska, a więc same w sobie nie będące komórkami nowotworowymi.

Trzustka jest narządem stosunkowo trudno dostępnym, a większość materiału biologicznego, jaki udaje się z niej pozyskać do badań, pochodzi z okaleczających zabiegów operacyjnych. Niemniej jednak, z powodu niebywalej zdolności do stromatogenezy, zarówno w przebiegu zmian zapalnych, jak i nowotworowych, jest narządem wyjątkowo dobrze nadającym się do badań porównawczych podścieliska w zmianach o różnej etiologii.

Celem niniejszej pracy była morfologiczna analiza porównawcza podścieliska raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki. Konstruując jej założenia konieczne było uświadomienie sobie, jakie elementy podścieliska należy ze sobą porównać. Niezależnie od etiologii procesu chorobowego strukturę podścieliska można podzielić na kilka tworzących je części:

a. Elementy pochodzenia mezenchymalnego.

Do tej kategorii należy zaliczyć przede wszystkim komórki o charakterze fibroblasta, odpowiedzialne za produkcję macierzy pozakomórkowej bogatej we włókna kolagenowe (*extracellular matrix ECM*). W toku badań okazało się, że nie jest to jednorodna grupa komórek. Część z nich ma fenotyp miofibroblasta (*ASMA+*), inne nabywają lub tracą ekspresję antygenu CD34, a ich funkcja nie jest do końca poznana (Kuroda 2004, 2005, Barth 2002). W odniesieniu do trzustki istotnym elementem podścieliska należącym do tej kategorii, są komórki gwiaździste (*pancreatic stellate cells, PSC*), które po zaktywowaniu, nabierają cech fenotypowych miofibroblastów i są głównie odpowiedzialne za włóknienie zrębu (Omary 2007).

b. Komórki zapalne.

Rola komórek zapalnych jako źródła cytokin, jest niezwykle istotna w tworzeniu podścieliska. Istnieją przesłanki, że biorą one udział w tworzeniu mikrośrodowiska wpływając na angiogenezę, na aktywność komórek fibroblastycznych, na nasilenie aktywności proliferacyjnej oraz na apoptozę przez co mogą kształtować złośliwość biologiczną nowotworu (Li 2007). Do tej kategorii komórek zaliczymy makrofagi, komórki tuczne, limfocyty, neutrofile, eozynofile, komórki dendrytyczne.

c. Łoże naczyniowe (mikrokążenie)

Do tej kategorii zaliczymy komórki pochodzenia endotelialnego, ich prekursorzy oraz pericyty. Wszystkie razem tworzą podstawę do tworzenia łoża naczyniowego (Armulik 2005).

d. Zrąb pozakomórkowy (*extracellular matrix, ECM*)

Skomplikowana sieć wzajemnie powiązanych struktur białkowych, zawierająca włókna kolagenowe, proteoglikany, cząsteczki kwasu hialuronowego, integryny, glikoproteiny adhezyjne oraz system białek enzymatycznych (Kumar 2005).

Uwzględniając powyższe elementy składowe tworzące podścielisko, dokonano wyboru takich elementów strukturalnych, które można scharakteryzować przy pomocy badania histopatologicznego. Analizując dostępne piśmiennictwo wybrano te parametry morfologiczne, które mogą różnić się w podścielisku nowotworowym i zapalnym:

1. Analiza różnic w dystrybucji komórek ASMA+ oraz CD34+ w podścielisku raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono znaczne różnice w dystrybucji komórek CD34+ i ASMA+ w badanych grupach. W podścielisku raka, w zdecydowanej większości przebadanych przypadków, nie stwierdzono żadnej ekspresji komórek podścieliskowych o fenotypie CD34+ (ekspresja 0) przy jednoczesnej bardzo wyraźnej ekspresji komórek ASMA (4+), a więc o fenotypie miofibroblasta. W 51 przypadkach raka (80%), fenotyp komórek podścieliska został oznaczony jako: CD34: 0 ,ASMA: 4+ lub 3+. Z kolei w podścielisku przewlekłego zapalenia, w 41 przypadkach (95%) ekspresję CD34 w komórkach podścieliska oceniono na 4+ i 3+ (w zdecydowanej większości przypadków) lub 2+(w 7 przypadkach). W kolejnych dwóch przypadkach określono tą ekspresję na 1+ i nie stwierdzono ani jednego przypadku przewlekłego zapalenia, w którym ekspresja CD34 w komórkach podścieliska została oceniona jako zerowa. Dodatkowo ekspresja komórek ASMA+ w podścielisku przewlekłego zapalenia była wyrażona prawie tak samo wyraźnie, jak w podścielisku raka. Powyższe dane wskazują, że z praktycznego punktu widzenia brak ekspresji CD34 w komórkach podścieliska przy jednoczesnej, wyraźnej ekspresji ASMA, silnie przemawia za histopatologicznym rozpoznaniem raka trzustki. Z kolei immunofenotyp komórek podścieliska wykazujący wyraźną ekspresję CD34 z dobrze lub średnio wyrażoną ekspresją ASMA przemawia przeciwko rozpoznaniu raka. Powyższe dane mają szczególne znaczenie w diagnostyce różnicowej dobrze zróżnicowanych raków przewodowych i przewlekłego zapalenia trzustki zwłaszcza w sytuacji, gdy histopatolog ma do dyspozycji

jedynie niewielką ilość materiału biopsyjnego. Podobne wyniki opisuje Barth i wsp. (2002) w odniesieniu do serii trzustek przebadanych pod tym samym kątem (12 przypadków raka gruczołowego, 8 przypadków przewlekłego zapalenia i 7 przypadków nowotworu endokrynnego wywodzącego się z wysp trzustkowych). Co ciekawsze brak ekspresji CD34 w komórkach podścieliska stwierdzono wtedy również we wszystkich siedmiu przypadkach guzów pochodzenia endokrynnego. Jest to interesujące spostrzeżenie, bo może wskazywać, że utrata tej ekspresji może być związana z parakrynnym efektem działania komórek nowotworowych różnego typu. Jeszcze bardziej zróżnicowaną grupę zmian patologicznych trzustki przebadali Kuroda i wsp. w 2004. Oprócz przypadków raka gruczołowego i przewlekłego zapalenia objął badaniami także guzy pochodzenia endokrynnego, oraz gruczolaki surowicze i śluzowe (razem 43 przypadki). Także w jego doniesieniu ostateczną konkluzją było stwierdzenie, że wyraźna obecność komórek CD34+ w podścielisku zmiany patologicznej silnie przemawia za etiologią zapalną, a nie nowotworową. Nawet w większości ścian gruczolakotorbielaków (9/11) nie stwierdzono ekspresji komórek CD34+. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć szereg doniesień na temat ekspresji komórek CD34+ w podścielisku zmian patologicznych w różnych narządach, które sumarycznie przedstawia poniższa tabela.

Autor/rok	Narząd	Ilość przypadków	Obecność komórek CD34+ w podścielisku	Obecność komórek ASMA+ w podścielisku
Shimasaki N 2006	Pęcherz moczowy	18	(-) w podścielisku raka	(+) w podścielisku raka
Kuroda 2005	Gruczoł piersiowy	64	(-) w podścielisku inwazyjnego raka	(+/-) w zmianach łagodnych i złośliwych
Cimpean 2005	Gruczoł piersiowy	112	(-) w podścielisku inwazyjnego raka	(+) w podścielisku inwazyjnego raka

Kuroda 2005	Jelito grube	26	(-) w podścielisku raka (+/-) w podścielisku rakowiaków	(+) w podścielisku zmian nowotworowych jelita grubego
Barth 2004	Jama ustna	39	(-) w podścielisku raków (-) czasami w podścielisku zmian zapalnych	(+) w podścielisku raków
Yazhou 2004	Gruzoł piersiowy	91	(-) w podścielisku zmian złośliwych	(+) w podścielisku zmian złośliwych
Chauhan 2003	Gruzoł piersiowy	135	(-) w podścielisku raków (-) czasami w podścielisku blizny gwiaździstej i odczynowego włóknienia	(+) w podścielisku raków i różnie w zmianach łagodnych
Barth 2002	Gruzoł piersiowy	58	(-) w podścielisku raka (+) w podścielisku zmian łagodnych	(+) w podścielisku zmian złośliwych i części zmian łagodnych
Nakayama 2000	Jelito grube	41	(-) w podścielisku raka	
Humphreys 2000 Illueca 1998 Swanson 1998 Kirchmann 1994	skóra		(-) w podścielisku raka podstawnokomórkowego (+) w podścielisku trichoepithelioma	

Z powyższego zestawienia wynika wyraźnie, że brak ekspresji CD34 w komórkach podścieliska było niemal regułą we wszystkich przebadanych seriach inwazyjnych nowotworów, niezależnie od zajętego narządu. Obecność komórek ASMA+ była różnie nasiloną, z tendencją do wzmożonej ekspresji w zmianach złośliwych.

Rola komórek podścieliska CD34+ jest najprawdopodobniej złożona. Glikoproteina CD34 jest markerem komórek pochodzenia endotelialnego oraz występuje w komórkach szpiku kostnego (Kumar 2005). Podścieliskowe komórki CD34+ zostały zidentyfikowane w wielu prawidłowych narządach m.in.: w gruczole piersiowym, tarczycy, jajowodzie, śliniance podżuchwowej, jelicie grubym, trzustce, oponach mózgowych, migdałkach podniebiennych, szyjce macicy (Yamazaki 1995, 1996a-b, 1997, Nakayama 2000, Cummings 2001, Papadas 2001, Barth 2002). Komórki dendrytyczne CD34+ występują także w obrębie zdrowej skóry

(Narvaez 1996). Obecnie dominuje teoria, że podścieliskowe komórki CD34+ pełnią podwójną funkcję: komórek prezentujących antygen oraz komórek produkujących włókna kolagenowe (typu I i III), przez co biorą udział w odnowie podścieliska (Bucala 1994, Chesney 1997). Ich rola w utrzymaniu integralności podścieliska i powstrzymaniu migracji komórek nowotworowych może być zatem niebagatelna. Dodatkowo, jako komórki prezentujące antygen, mogą także brać udział w swoistej odpowiedzi immunologicznej na obecność antygenów nowotworowych. W związku z tym, wyjaśnienie w jaki sposób komórki inwazyjnego nowotworu wpływają na obecność komórek CD34+ doprowadzając do ich „zaniku”, jest niezwykle istotne dla zrozumienia patomechanizmu tworzenia nowotworowego podścieliska. W 2001 roku Katsenelson i wsp. udowodnili, że komórki nowotworów endokrynnych płuc są w stanie nasilać apoptozę komórek dendrytycznych CD34+ w bezpośrednim sąsiedztwie guza oraz hamować różnicowanie szpikowych prekursorów do dojrzałych komórek dendrytycznych. Powyższy patomechanizm może być potencjalnym wyjaśnieniem wyników badań niniejszej pracy, ale udowodnienie czy na pewno obowiązuje on także w odniesieniu do raka gruczołowego, wymaga dalszych badań. Odrębnym zagadnieniem pozostaje interpretacja wyników ekspresji komórek ASMA+ w podścielisku raka i zapalenia trzustki. W obu grupach stwierdzono znaczny wzrost ekspresji tych komórek w podścielisku, w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast różnice w ilości komórek ASMA+ w podścielisku raka w porównaniu z podścieliskiem przewlekłego zapalenia nie są duże, z tendencją do nieco bardziej wzmożonej ekspresji w podścielisku raka. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że dystrybucja komórek w obu badanych grupach wykazuje pewne różnice nawet w obrębie przypadków o nasilonej ekspresji. Okazało się bowiem, że w grupie przewlekłego zapalenia, w której znacznie częściej niż w raku dochodziło do nasilonego bliznowacenia i szkliwienia podścieliska w centralnych częściach obszarów bogatych w podścielisko, ekspresja komórek ASMA+ jest mniejsza. Natomiast w raku

trzustki, w przypadkach o nasilonej ekspresji ASMA w komórkach podścieliska, odczyn jest rozlany, równomiernie nasilony w obrębie całego podścieliska. Powyższa obserwacja znajduje odzwierciedlenie w zestawieniu wyników - w grupie przewlekłego zapalenia aż w 14 przypadkach nasilenie ASMA oceniono na 2+: reakcja wyraźnie zaznaczona ogniskowo (w przypadku zmian zapalnych głównie około i śródzrazikowo), w porównaniu z jednym przypadkiem w grupie raka. O takim samym typie dystrybucji komórek ASMA+ w podścielisku zmian zapalnych trzustki wspomina w swoim artykule wcześniej cytowany Kuroda (2004).

Powyższe wyniki wskazują, że zarówno w raku trzustki, jak i w zapaleniu trzustki w procesie stromatogenezy podstawową rolę odgrywają komórki o charakterze miofibroblasta. Obecnie szeroko akceptowana jest teza, że komórki o fenotypie miofibroblasta są głównie efektem patologicznego pobudzenia trzustkowych komórek gwiaździstych (*pancreatic stellate cells, PSC*) (Omary 2007). W wyniku pobudzenia komórek gwiaździstych, które w warunkach zdrowia są zlokalizowane w sąsiedztwie zrazików trzustkowych oraz okołoprzewodowo i okołonaczyniowo (Watari 1982, Ikejiri 1990, Apte 1998, Bachem 1998), dochodzi do zmiany ich fenotypu z komórek zaangażowanych głównie w metabolizm witaminy A (podobnie jak wątrobowe komórki gwiaździste, HSC), w komórki zdolne do produkcji włókien kolagenowych oraz obdarzone zdolnością do migracji i posiadające właściwości kurczliwe, czyli w komórki o fenotypie miofibroblasta. W odróżnieniu od komórek gwiaździstych w stanie spoczynku ich pobudzone odpowiedniczki wykazują silną reakcję z ASMA (*alfa smooth muscle actin*). Jest to jedyny marker immunohistochemiczny, który może zróżnicować aktywowane komórki gwiaździste od pozostających w spoczynku. Pozostałe znane markery immunohistochemiczne komórek gwiaździstych takie jak wimentyna, desmina, GFAP (*glial fibrillary acid protein*) czy nestyna, mogą wypadać dodatkowo niezależnie od stanu metabolicznego tych komórek. Dodatkowo, pobudzone komórki gwiaździste nabierają

zdolności do produkcji wspomnianych wcześniej włókien kolagenowych (Apte 2004, Haber 1999).

Zgodnie z obecną wiedzą, patomechanizm pobudzenia komórek gwiaździstych jest taki sam w przypadku zmian nowotworowych, jak i zapalnych. Głównymi mediatorami odpowiedzialnymi za to działanie są PDGF (*platelet derived growth factor*), TGF β (*transforming growth factor β*) i angiotensyna II (Menke 2002, Jaster 2004, Apte 2004). Wykazano jednocześnie, że aktywowane komórki gwiaździste gromadzą się głównie w regionach bogatych w komórki nacieku zapalnego z ogniskami martwicy, a więc w regionach bogatych w cytokiny, czynniki wzrostu i wolne rodniki (Apte 2003, Bentrem 2003, Klóppel 2004). Powyższe dane mogą być wyjaśnieniem morfologicznej dystrybucji komórek ASMA+ w podścielisku przewlekłego zapalenia (ze zmniejszoną ekspresją w centralnych częściach obszarów nasilonego włóknienia), gdzie najprawdopodobniej aktywność procesu zapalnego ulega wygaszeniu, tak jak ma to miejsce w centralnych częściach obszarów bliznowacenia np. w procesie gojenia rany w skórze, czy gojenia się ogniska zawału niedokrwiennego w obrębie mięśnia serca. Z kolei zwiększona ekspresja komórek ASMA+, jaką zaobserwowano w podścielisku raka trzustki, ma najprawdopodobniej związek z ciągłym, parakrynnym pobudzaniem komórek gwiaździstych przez komórki raka. W tym momencie dochodzimy do koncepcji „rany, która się nigdy nie goi”, wysuniętej przez Dvoraka w 1986, w której autor porównuje podścielisko nowotworowe do wciąż aktywowanej tkanki ziarninowej. W świetle danych uzyskanych dzięki rozwojowi biologii molekularnej, koncepcja ta wydaje się nabierać nowego znaczenia.

Istnieje szereg doniesień, głównie z badań eksperymentalnych przeprowadzonych na zwierzętach, że aktywowane komórki gwiaździste oraz komórki raka trzustki, nasilają wzajemnie swój indeks proliferacyjny (Koninger 2004, Yoshida 2004, Bachem 2005). Niestety prawie nie ma doniesień na ten temat opartych na badaniu ludzkich narządów.

Jedyną tego typu pracą jest doniesienie Watanabe z 2003, w którym stwierdza gorsze rokowanie u pacjentów cierpiących na raka trzustki, u których stwierdzono wyższy indeks proliferacyjny fibroblastów podścieliska. Z drugiej strony, istnieją doniesienia oparte także na pracach eksperymentalnych, że podścielisko raka trzustki ma wpływ na wzrost guza nowotworowego poprzez hamowanie apoptozy komórek raka, dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu białek ECM (Vaquero 2003, Edderkaoui 2005).

2. Analiza różnic w dystrybucji makrofagów, komórek tucznych, limfocytów oraz gęstości naczyń mikrokrążenia (MVD) w podścielisku raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki.

Elementy nacieku zapalnego są istotną częścią podścieliska, niezależnie od etiologii procesu chorobowego. Od wielu lat znana jest kluczowa rola makrofagów w przewlekłym procesie zapalnym. Makrofagi pobudzane przez immunizowane komórki T (głównie dzięki działaniu $IFN\gamma$) wydzielają szereg substancji, które z jednej strony mogą powodować uszkodzenie tkanki (metabolity nadtlenkowe, proteazy, czynniki chemotaktyczne neutrofilii, czynniki krzepnięcia, tlenek azotu), a z drugiej wpływają na włóknienie i angiogenezę dzięki wydzielaniu licznych czynników wzrostu (PDGF, FGF, TGF β) (Kumar 2005). Nieodwracalnym efektem ich działania jest zatem udział w tworzeniu włóknistego zrębu, który jest głównym wykładnikiem morfologicznym przewlekłego zapalenia. Mając na uwadze powyższe mechanizmy, możemy spodziewać się, że także w przypadku przewlekłego zapalenia trzustki, udział makrofagów w procesie formowania podścieliska jest niebagatelny. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa można stwierdzić, że także w tworzeniu podścieliska nowotworowego makrofagi odgrywają równie istotną rolę (tabela w dalszej części Dyskusji). Istnieją jednak rozbieżności opinii co do ich wpływu na złośliwość biologiczną nowotworu.

W niniejszej pracy, stwierdzono znamienne statystycznie różnice w dystrybucji makrofagów w podścielisku raka trzustki i zapalenia trzustki w porównaniu z prawidłowym narządem. Ponadto ilość makrofagów w podścielisku raka jest wyraźnie większa niż w podścielisku przewlekłego zapalenia (średnia ilość makrofagów w podścielisku raka: 68,54/pole widzenia, a w przewlekłym zapaleniu: 34,13/pole widzenia). Jak do tej pory pojawiły się nieliczne prace porównujące udział komórek zapalnych w tworzeniu podścieliska w raku i zapaleniu trzustki. W doniesieniach tych także zwraca uwagę większa ilość komórek jednojądrowych (w tym makrofagów) w przypadku raka, w porównaniu z przewlekłym zapaleniem (Esposito 2004, Jaśkiewicz 2003, Emmrich 1998). Pojawia się zatem pytanie, czy makrofagi obecne w tak dużej ilości w podścielisku raka pełnią taką samą funkcję, jak w przewlekłym zapaleniu i czy są pobudzane na drodze takich samych patomechanizmów.

W toku badań pojawił się termin określający makrofagi w mikrośrodowisku guza nowotworowego jako TAM (*tumor-associated macrophages*) z uwagi na postulowaną zmianę ich aktywności biologicznej. W licznych badaniach stwierdzono zależność pomiędzy ilością makrofagów, a czasem przeżycia chorych na różne nowotwory. W większości doniesień stwierdzono gorsze rokowanie u pacjentów ze zwiększoną ilością makrofagów w podścielisku guza, ale są także prace, w których stwierdzono odwrotną zależność. W wielu pracach zwrócono także uwagę na korelację pomiędzy ilością makrofagów, a nasileniem angiogenezy wskazującą, że proangiogenne działania makrofagów może przyczyniać się do zwiększenia złośliwości biologicznej nowotworu. Istnieją także doniesienia, w których wykazano korelację pomiędzy ilością makrofagów w podścielisku, a częstością występowania przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Przegląd piśmiennictwa na temat roli makrofagów w kształtowaniu aktywności biologicznej nowotworu przedstawia poniższa tabela.

Autor/rok	Narząd lub typ nowotworu	Korelacja liczby makrofagów z rokowaniem	Korelacja liczby makrofagów z nasileniem angiogenezy	Korelacja liczby makrofagów z ilością przerzutów węzłowych
Tsutsui 2005	Gruczoł piersiowy	gorsze	jest	jest
Leek 2002	Gruczoł piersiowy	gorsze	jest	BD
Lissbrant 2000	prostata	gorsze	jest	BD
Ohno 2004	endometrium	gorsze	jest	BD
Hanada 2000	Pęcherz moczowy	gorsze	jest	jest
Jadus 1996	przetyk	gorsze	BD	jest
Farinha 2005	Chłoniak grudkowy	gorsze	BD	BD
Ohno 2003	żołądek	lepsze	BD	BD
Funada 2003	Jelito grube	lepsze	BD	BD
Piras 2005	Czerniak złośliwy skóry	lepsze	BD	BD
Khorana 2003	Jelito grube	Brak korelacji	BD	BD
Johnson 2000	Płuco	Brak korelacji	BD	BD
Davidson 1999	Szyjka macicy	Brak korelacji	BD	BD

BD – brak danych

Powyższe dane mogą sugerować, że makrofagi zaangażowane w kształtowanie podścieliska nowotworowego zatracają pierwotne właściwości komórek prezentujących antygen i stymulujących proliferację komórek T i NK, a zatem pobudzających układ immunologiczny do walki z rakiem, przekształcając się w komórki zaangażowane głównie w stymulowanie angiogenezy i pobudzanie proliferacji komórek guza, a więc spełniających dokładnie odwrotne funkcje. Wysłunięto wobec tego hipotezę, że makrofagi w obrębie guza nowotworowego mogą ulegać alternatywnej aktywacji, przekształcając się w komórki podtrzymujące rozplam komórek raka (*alternatively activated/M2 macrophages*). Teoria ta znalazła potwierdzenie w pracach eksperymentalnych, w których stwierdzono tego typu aktywację makrofagów poddanych działaniu cytokin nowotworowych takich jak IL-4 i IL-10 (Mantovani 2002, 2006).

Obecnie postuluje się udział alternatywnie stymulowanych makrofagów w zwiększeniu inwazyjności nowotworu poprzez produkcję enzymów proteolitycznych w sąsiedztwie błon podstawnych (Domagała 1992), pobudzanie aktywności metaloproteinaz (Tang 2004), czy wydzielanie EGF (*epidermal growth factor*) odpowiedzialnego za pobudzenie genów zaangażowanych w zwiększenie inwazyjności komórek raka i zwiększających ich indeks proliferacyjny (Goswami 2005). Stymulujący wpływ makrofagów na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych stwierdzono między innymi w badaniach nad rakiem gruczołu piersiowego (Tsutsui 2005) i rakiem nerki (Hamada 2002). Powyższe dane znajdują także potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach (Polverini 1987, Sieweke 1990).

Makrofagi mogą mieć dużą skłonność do nasilania angiogenezy w podścielisku nowotworowym. Przegląd doniesień na temat korelacji nasilenia angiogenezy z ilością makrofagów wskazuje, że nie jest to zbieżność przypadkowa (tabela str.41). Obecnie wysuwa się tezę, że makrofagi kooperują z komórkami nowotworowymi w obszarach niedokrwienia, wydzielając szereg proangiogennych cytokin, które przenikają do sąsiadujących komórek pochodzenia endotelialnego stymulując ich proliferację (Lewis 1995, Sunderkotter 1991).

Wyniki badania gęstości naczyniowej w niniejszej pracy wskazują, że gęstość naczyniowa w podścielisku raka trzustki jest większa niż w grupie kontrolnej (56,67/pole widzenia w podścielisku raka vs. 43,37/pole widzenia w podścielisku grupy kontrolnej). Nie stwierdzono jednak statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy gęstością naczyniową, a ilością makrofagów ani w podścielisku raka trzustki, ani przewlekłego zapalenia. W świetle powyższych rozważań na temat roli makrofagów w podścielisku nowotworowym brak takich korelacji wymaga wyjaśnienia. Wydaje się, że głównym problemem w ocenie mikrokrążenia jest wybór metody liczenia naczyń i brak wystandaryzowanych metod liczenia. W doniesieniu Esposito z 2004 na temat angiogenezy w raku trzustki średnia wartość ilości naczyń

mikrokrążenia wynosiła 101,06/pole widzenia (powiększenie 200x jak w niniejszej pracy). Tylko w pojedynczych badaniach nad gęstością naczyń w podścielisku nowotworowym stwierdzono średnie wartości poniżej 100/pole widzenia i prace te pochodzą głównie z wczesnych lat dziewięćdziesiątych (Macchiarini 1992, 1994, Inoue 1997). Wydaje się zatem, że średnia wartość gęstości naczyń w podścielisku raka i zapalenia trzustki podana w niniejszej pracy może być zaniżona i nie odzwierciedlać w pełni potencjału proliferacyjnego łoża naczyniowego. Taki wniosek nasuwa się także po przeanalizowaniu różnicy wartości średniej gęstości naczyń pomiędzy podścieliskiem przewlekłego zapalenia, a grupą kontrolną (45,4 vs. 43,37), która jest bardzo mała. Wpływ na potencjalne zniżenie wartości gęstości mikrokrążenia mogło mieć kilka czynników:

- wybór metody liczenia naczyń – liczone naczynia posiadające wyraźne światło w powiększeniu 200x, a zatem dobrze ukształtowane, pomijając zagęszczenia komórek pochodzenia endotelialnego pozbawione światła i nie zliczając naczyń, których światło uległo zapadnięciu (taką skłonność mogą mieć nowo utworzone struktury naczyniowe mikrokrążenia, w przeciwieństwie do dobrze uformowanych, bardziej dojrzałych naczyń (Lewis 2006))

- wybór przeciwciała do liczenia struktur naczyniowych – zdecydowano się na CD31, aby nie pomylić struktur naczyniowych w podścielisku przewlekłego zapalenia z komórkami podścieliska CD34+. W większości aktualnych doniesień na temat mikrokrążenia jest stosowane przeciwciało przeciw CD34, które jest uważane za bardziej czuły i stabilny marker struktur naczyniowych.

Mała różnica w średniej ilości naczyń mikrokrążenia pomiędzy grupą kontrolną, a zapaleniem trzustki wynika najpewniej z dwóch przyczyn:

- stwierdzonej powyżej tendencji do zapadania się nowo utworzonych naczyń w podścielisku zapalnym, których nie zliczano,

- fizjologicznie bogatego unaczynienia mięszu prawidłowej trzustki.

Opisywanie mikrokrążenia tylko na podstawie oceny gęstości naczyniowej, a co za tym idzie poszukiwanie korelacji z innymi elementami podścieliska używając jedynie wartości w ten sposób uzyskanych, wydaje się niewystarczające. Być może należałoby najpierw ustalić, jaka jest dojrzałość łoża naczyniowego np. za pomocą zliczenia naczyń otoczonych warstwą pericytów (Yonenaga 2005), a wszelkie korelacje wykonywać przy uwzględnieniu dojrzałości naczyń mikrokrążenia.

Skupiając się na roli makrofagów w kształtowaniu podścieliska raka i zapalenia trzustki, do tej pory nie wspomniano o roli komórek tucznych. W rzeczywistości komórki nacieku zapalnego są od siebie uzależnione i wchodzi w ścisłe relacje z podścieliskiem, które współtworzą (Zimnoch 2002) Uważa się, że komórki tuczne (*mast cells, mastocyty*) także mogą być odpowiedzialne za wytwarzanie czynników proangiogennych, a ich rola w nasilaniu biologicznej złośliwości nowotworów została opisana między innymi w odniesieniu do czerniaka złośliwego (Ribatti 2003), raka niedrobnokomórkowego płuc (Chen 2003, Takanami 2000 - w tej pracy stwierdzono także korelację pomiędzy gęstością komórek tucznych w guzie, a ilością przerzutów węzłowych), raka przełyku (Elpek 2002), raka trzonu i szyjki macicy (Benitez-Bribiesca 2001). Ponadto w pracach doświadczalnych wykazano wpływ proteaz obecnych także w komórkach tucznych trzustki (tryptazy i chymazy), na nasilenie angiogenezy (Taipale 1995, Muramatsu 2000). Wyniki niniejszej pracy wskazują na znaczny udział mastocytów w tworzeniu podścieliska przewlekłego zapalenia i raka trzustki. W porównaniu z grupą kontrolną różnice w ilości komórek tucznych są statystycznie znamienne, ale różnica w ilości mastocytów w podścielisku raka w porównaniu z zapaleniem jest już niewielka i znajduje się na granicy znamienności statystycznej. Jak wspomniano, nie stwierdzono także korelacji pomiędzy ilością komórek tucznych, a gęstością mikrokrążenia, być może z powodów związanych z wyborem metodyki zliczania struktur naczyniowych. Co

za tym idzie, na podstawie przeprowadzonych badań nie można wyciągać jednoznacznych wniosków co do wpływu mastocytów na tworzenie mikrośrodowiska w guzie nowotworowym.

Analizując skład nacieku zapalnego złożonego z komórek jednojądrowych w podścielisku raka i zapalenia trzustki, należy także ustosunkować się do występujących tam w bardzo dużych ilościach limfocytów. W rzeczywistości ilość limfocytów zdecydowanie przewyższa ilość makrofagów i komórek tłuszczowych, głównie dzięki tworzeniu miejscami skupień i grudek chłonnych. W niniejszej pracy nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w całkowitej ilości limfocytów pomiędzy podścieliskiem zapalenia i raka trzustki. Natomiast w porównaniu z grupą kontrolną ilość ta jest zdecydowanie większa. W patogenezie przewlekłego zapalenia trzustki, część przypadków nadal jest określana mianem zapaleń idiopatycznych. Obecnie postuluje się autoimmunologiczny mechanizm rozwoju części z nich (Jaśkiewicz 2003). W odniesieniu do takiej możliwości, istotna wydaje się ocena składu nacieku limfatycznokomórkowego z podziałem na konkretne subpopulacje, w przypadkach zapaleń trzustki o różnej etiologii. Samo zwiększenie ilości limfocytów w podścielisku raka trzustki i zapalenia trzustki może być interpretowane co najwyżej jako wyraz nieswoistej reakcji zapalnej.

Podsumowując powyższą dyskusję, należy stwierdzić, że tworzenie podścieliska w przewlekłym zapaleniu i raku trzustki wykorzystuje wiele wspólnych patomechanizmów takich jak uwolnienie cytokin w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek, zwiększoną aktywność komórek zapalnych, pobudzenie trzustkowych komórek gwiaździstych, nasilenie angiogenezy. Z drugiej strony wiele podobieństw między tymi procesami może być tylko powierzchowne, a mikrośrodowisko powstałe w tych chorobach może pełnić odmienne funkcje. Uchwycenie różnic w funkcjonowaniu podścieliska nowotworowego i zapalnego

może w przyszłości doprowadzić do znacznego postępu we wczesnej diagnostyce raka trzustki oraz przyczynić się do powstania nowych, bardziej wydajnych strategii leczniczych.

WNIOSKI

1. Stwierdzono znaczne różnice w dystrybucji komórek CD34+ oraz ASMA+ w podścielisku raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki:
 - 1.1 W większości przypadków raka trzustki w komórkach podścieliska dominuje immunofenotyp: CD34 (-), ASMA (+, odczyn wyraźnie zaznaczony)
 - 1.2 W większości przypadków przewlekłego zapalenia trzustki w komórkach podścieliska dominuje immunofenotyp: CD34 (+, odczyn wyraźnie zaznaczony), ASMA (+, odczyn wyraźnie lub średnio zaznaczony)
2. Stwierdzone powyżej różnice w dystrybucji komórek CD34+ i ASMA+ w podścielisku raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki mogą służyć jako dodatkowy wykładnik morfologiczny w histopatologicznej diagnostyce różnicowej pomiędzy tymi chorobami.
3. Stwierdzono różnice w ilości makrofagów i komórek tucznych w podścielisku raka trzustki i przewlekłego zapalenia trzustki:
 - 3.1 Ilość makrofagów w podścielisku raka trzustki jest wyraźnie większa niż w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki
 - 3.2 Ilość komórek tucznych w podścielisku raka trzustki jest nieznacznie większa niż w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki
 - 3.3 Ilość makrofagów i komórek tucznych zarówno w podścielisku raka trzustki jak i przewlekłego zapalenia trzustki jest wyraźnie większa niż w podścielisku grupy kontrolnej zdrowych trzustek

4. Stwierdzono większą gęstość naczyniową mikrokrażenia w podścielisku raka trzustki w porównaniu z gęstością naczyniową mikrokrażenia w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki.
5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ilością makrofagów lub komórek tłuszczowych, a gęstością naczyniową mikrokrażenia w podścielisku badanych grup.

STRESZCZENIE

Tworzenie podścieliska jest istotnym elementem wzrostu guza nowotworowego oraz odgrywa podstawową rolę w procesie przewlekłego zapalenia. Trzustka z racji wyjątkowej zdolności do tworzenia podścieliska zarówno w przebiegu zmian zapalnych, jak i nowotworowych, jest narządem doskonale nadającym się do badań porównawczych podścieliska w zmianach o różnej etiologii. Rak trzustki jest nowotworem obarczonym wysoką śmiertelnością, nie poddającym się w większości wypadków standardowym strategiom leczniczym, dającym często pierwsze objawy w okresie znacznego zaawansowania choroby nowotworowej. Zrozumienie różnic funkcjonalnych i strukturalnych pomiędzy podścieliskiem nowotworowym, a zapalnym może dać szansę na wytyczenie nowych dróg w postępowaniu diagnostyczno-leczniczym tych chorób.

Celem pracy była morfologiczna ocena porównawcza podścieliska w przewlekłym zapaleniu i raku trzustki, pod kątem dystrybucji komórek CD34+ i ASMA+ oraz ilości makrofagów, komórek tucznych i gęstości mikrokrążenia. Ponadto dokonano oceny wartości diagnostycznej części powyższych parametrów w histopatologicznej diagnostyce różnicowej tych schorzeń.

Do badań zakwalifikowano 62 przypadki pierwotnego raka gruczołowego trzustki (38 mężczyzn i 24 kobiety) oraz 43 przypadki przewlekłego zapalenia trzustki (32 mężczyzn i 11 kobiet) operowanych w latach 1998-2005 w I i II Klinice Chirurgii Ogólnej AMG. Grupę kontrolną stanowiło 20 fragmentów mięszu trzustek pobranych ze zwłok osób zmarłych z innych przyczyn. Odczyny immunohistochemiczne i histochemiczne wykonano na materiale tkankowym opracowanym w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii AMG. Komórki podścieliska wyznakowano przeciwciałami monoklinalnymi przeciw CD34 oraz ASMA, naczynia mikrokrążenia wyznakowano przeciwciałem przeciw CD31, makrofagi

wyznakowano przeciwciałem przeciw CD68, limfocyty przeciwciałem przeciw LCA, a komórki tuczne wyznakowano rutynową metodą Giemsy.

Stwierdzono znaczne różnice w dystrybucji komórek CD34+ i ASMA+ w podścielisku raka i przewlekłego zapalenia trzustki: W 51 przypadkach raka (80%), fenotyp komórek podścieliska został oznaczony jako: CD34: 0 ,ASMA: 4+ lub 3+. Z kolei w podścielisku przewlekłego zapalenia w 41 przypadkach (95%) ekspresję CD34 w komórkach podścieliska oceniono na 4+ lub 3+, przy równoczesnej wyraźnej ekspresji komórek podścieliskowych ASMA+. Powyższe różnice mogą służyć jako dodatkowy wykładnik morfologiczny w histopatologicznej diagnostyce różnicowej przewlekłego zapalenia i raka trzustki.

Ponadto stwierdzono znacznie większą ilość makrofagów w podścielisku raka trzustki w porównaniu z podścieliskiem przewlekłego zapalenia trzustki (65,54/PW vs. 34,13/PW) oraz niewielki wzrost ilości komórek tucznych w podścielisku raka (10,94/DPW vs. 9,9/DPW). Gęstość mikrokrażenia w podścielisku raka trzustki jest większa od gęstości mikrokrażenia w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki (56,67/PW vs. 46,4/PW. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy ilością makrofagów lub komórek tucznych, a gęstością mikrokrażenia w żadnej z badanych grup.

ABSTRACT

Comparative morphologic assessment of the stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis.

The formation of the stroma is crucial for the growth of the the neoplastic tumor and in the chronic inflammatory process. The pancreas has enormous ability to stroma formation in the course of both aforementioned processes giving the unique opportunity for comparative studies. Pancreatic adenocarcinoma (PDA) is the neoplasm with a dismal prognosis, usually resistant to classic therapeutic strategies. The understanding of structural and functional differences between neoplastic and inflammatory stroma, may one day lead to discoveries of new diagnostic and therapeutic procedures of these fatal diseases.

The purpose of this study was comparative morphologic analysis of the stroma in CP and PDA, considering the distribution of CD34+ and ASMA+ stromal cells, macrophages, mast cells and microvascular density (MVD). Furthermore, the diagnostic significance of above mentioned differences was assessed from the histopathologic point of view.

62 cases of PDA (38 male and 24 female) and 43 cases of CP (32 male and 11 female) were qualified. All patients underwent surgical procedures in the General Surgery Departments, Medical University of Gdansk in the years 1998-2005. Additionally 20 samples of the pancreatic parenchyma taken during autopsies from the patient without pancreatic illness, formed the control group. Histochemical and immunohistochemical staining were performed on the material from the Department of Pathology, Medical University of Gdansk archives. The following monoclonal antibodies were used in the study: anti-CD34 and anti-ASMA to stain stromal cells, anti-CD31 to highlight the microcirculation , anti-CD68 to stain macrophages and anti-LCA to stain lymphocytes. Mast cells were highlighted with the routine Giemsa method.

There were clear differences in the distribution of CD34+ stromal cells and ASMA+ stromal cells in the CP and PDA groups: immunofenotype of 51 cases of PDA (80%) was: CD34(-), ASMA (3+ or 4+). On the other hand, the stromal cells in 41 cases of CP (95%) were: CD34(3+ or 4+) and ASMA (3+or 4+). The above mentioned differences can serve as the additional tool in the histopathologic differential diagnosis between CP and PDA.

There were much more macrophages in the stroma of PDA in comparison with CP (65,54/HPF vs. 34,23/HPF) and only little more mast cells in the stroma of PDA (10,94/HPF vs. 9,9/HPF). Microvascular density (MVD) was higher in he stroma of PDA in comparison with CP (56,67/HPF vs. 46,4/HPF). We found no statistical correlation between MVD and the quantity of macrophages or mast cells in the studied groups.

PIŚMIENNICTWO

1. Adler G, Schmid RM: Chronic pancreatitis: still puzzling? *Gastroenterology* 112:1762, 1997
2. Albazaz R, Verbeke CS, Rahman SH, McMahon MJ: Cyclooxygenase-2 expression associated with severity of PanIN lesions: a possible link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology* 5: 361-369. 2005
3. Andea A, Sarkar F, Adsay VN: Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 16: 996-1006, 2003
4. Apte MV, Wilson JS: Mechanisms of pancreatic fibrosis. *Dig. Dis.* 22: 273-279, 2004
5. Apte MV, et al: Desmoplastic reaction in pancreatic cancer. Role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29: 179-187, 2004
6. Apte MV, Wilson JS: Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas.* 27:316-320, 2004
7. Apte MV, et al: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture. *Cancer Res,* 43: 128-133, 1998
8. Bachem MG et al: Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology.* 128: 907-921, 2005
9. Bachem MG, et al: Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 115:421-432, 1998
10. Bardeesy N, De Pinho RA: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2:897, 2002
11. Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R: CD34+ fibrocytes, alpha smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx and larynx. *Virchow Arch.* Mar;444(3):231-4, 2004
12. Barth PJ, Ebrahimsawe S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A: CD34 fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 440: 128-133. 2002
13. Barth PJ, Ramswamy A, Moll R: CD34+ fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of cervix uterine. *Virchows Arch.* 441, 564-568, 2002

14. Benitez-Bribiesca L, Wong A, Utrera D et al: The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem*; 49: 1061-2, 2001
15. Bentrem DJ, Joehl RJ: Pancreas: healing response in critical illness. *Crit Care Med*. 31(suppl 8):S582-S589, 2003
16. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81
17. Chauchan H, Abraham A, Philips RA et al: There is more than one kind of myofibroblasts; analysis of CD34 expression in benign, in situ and invasive breast lesion. *J Clin Pathol*. 56, 271-276, 2003
18. Chen JJ, Yao PL, Yuan A et al: Up regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*;9: 729-37, 2003
19. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R: The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naïve T-cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6307-6312, 1997
20. Cimpean AM, Raica M, Narita D: Diagnostic significance of the immunorexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. *Rom J Morphol Embryol*;46(2):123-129, 2005
21. Cummings TJ, Burxhette JL, McLendon RE: CD34 and dural fibroblasts: the relationship to solitary fibrous tumor and meningioma. *Acta Neuropathol*. 102 349-354, 2001
22. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH et al: Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma – clinicopathologic correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand*;78:240-4, 1999
23. Demetri GD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472, 2002
24. Domagała W, Striker G, Szadowska A et al: Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry. No correlation with survival at 5 years. *Am J Pathol* 1992;141:1003-12
25. Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. Dec 25;315(26):1650-9. Review. 1986
26. Edderkaoui M et al.: Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol*.289: G1137-1147, 2005

27. Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH et al: The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol*; 54: 940-4, 2001
28. Emmrich J, Weber I et al: Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*;59(3):192-8. 1998
29. Esposito I, Kleeff J, Bischoff SC, Fischer L et al: The stem cell factor c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest*Nov:82(11):1481-92. . 2002
30. Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F et al: Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*; 57: 630-636. 2004
31. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF et al: Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma associated macrophages (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma. *Blood*;106:2169-74. 2005
32. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and others disease. *Nat Med*, 1: 27-31, 1995
33. Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R et al: Prognostic significance of CD+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2003;10:309-13
34. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB et al: Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 2005;65:5278-83
35. Haber PS et al: Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*, 155: 1087-1095, 1999
36. Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350, 1996
37. Hamada I, Kato M, Yamasaki T et al: Clinical effects of tumor associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:4281-4
38. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A et al: Prognostic value of tumor associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 2000;7:263-269
39. Hayden MS, Ghosh S: Signalling to NFκB. *Genes Dev* 18: 2195-2224. 2004
40. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE: Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 156:1821, 2000
41. Humphreys TR, Monteiro MR, Murphy GF: Mast cells and dendritic cells in basal cell carcinoma stroma. *Dermatol Surg* 26:200-203, 2000

42. Ikejiri N: The vitamin-A storing cells in the human and rat pancreas. *Kurume Med J* 37: 67-81, 1990
43. Illueca C, Monteagudo C, Revert A, Llombart-Bosch A: Diagnostic value of CD34 immunostaining in desmoplastic trichilemmoma. *J Cutan Pathol* 25:435-439, 1998
44. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T et al: Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;79:206-213
45. Jackson AL, Loeb LA: The mutation rate and cancer. *Genetics*. 1998 Apr;148(4):1483-90. Review.
46. Jadus MR, Irwin MC, Irwin MR et al: Macrophages can recognize and kill tumor cells bearing the membrane isoform of macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1996;87:5232-42
47. Jaster R: Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol. Cancer*.3:26
48. Jaśkiewicz K, Nalecz A, Rzepko R, Śledziński Z: Immunocytes and activated stellate cells in pancreatic fibrogenesis. *Pancreas*. 2003. Apr;26(3):239-42
49. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD et al: Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2000;27:27-35
50. Katsenelson NS, Shurin GV, Bykovskaia SN, Shogan J, Shurin MR: Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function. *Mod Pathol*. 2001 Jan; 14910:40-5
51. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, et al: Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patient with stage II and stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003; 97: 960-8
52. Kingsnorth A: Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 40:1, 1997
53. Kirchmann TT, Prieto VG, Smoller BR: CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. *Arch Dermatol* 130: 589-592, 1994
54. KlöppelG, Detlefsen S, Feyerebend B: Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchow Arch*. 445:1-8, 2004
55. Klöppel G: Progression from acute to chronic pancreatitis, a pathologist's view. *Surg Clin North Am* 79:801, 1999
56. Koninger J et al: Pancreatic tumor cells influence the composition of extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 322:943-949, 2004
57. Kumar V, Abbas AK, Fausto N: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7th edition. Elsevier Saunders

58. Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Toi E, Hiroi M, Enzan H: The distribution of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in colorectal carcinoid tumors. *Histol Histopathol* (2005) 20: 27-33
59. Kuroda N, Jin Y-L, Hamauzu T, Toi M, Miyazaki E, Moriki T, Enzan H: Consistent lack of CD34-positive stromal cells in the stroma of malignant breast lesions. *Histol Histopathol* (2005) 20: 707-712
60. Kuroda N, Toi M, Nakayama H, Miyazaki E, Yamamoto M, et al: The distribution and role of myofibroblasts and CD34-positive stromal cells in normal pancreas and various pancreatic lesions. *Histol Histopathol* (2004) 19: 59-67
61. Leek RD, Harris AL: Tumour associated macrophages in breast cancer. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*. 2002; 7:177-89
62. Lewis CE, Pollard W: Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res* 66;605-612, 2006
63. Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO: Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor associated macrophages. *J Leukoc Biol* 1995;57: 747-51
64. Li H, Fan X, Houghton JM: Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 2007 Jan 16
65. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P et al: Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 2000;17:445-51
66. Liu YL, Zhao MQ, Hou G, Miao F, Liu W: Effects of mast cell infiltration on the development and metastasis of gastric carcinoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Bao*. 2005 Jul; 25(7);809-11
67. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:776,2003
68. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Parrault J, Whitcomb DC: 1997. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89: 442-446
69. Macchiarini P, Fontanini G, Dulmet E, Montpreville V et al: Angiogenesis: an indicator of metastases in non-small cell lung cancer invading the thoracic inlet. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:1534-39
70. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M, Squartini F et al: Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992;340:145-146

71. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruzniewski P. 2002: Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 51: 849-952
72. Mantovani A, Schioppa T: Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):315-22.
73. Mantovani A, Sozzani S, Locati M et al: Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-555
74. Marshall JB: Acute pancreatitis; a review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med* 153:1185, 1993
75. McWilliams R, Highsmith WE, Rabr KG, de Andrade M, Tordsen LA, et al.: 2005. Cystic fibrosis transmembrane regulator gene carrier status is a risk factor for young onset pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 54. 1661-1662
76. Menke A, Adler G: TGFbeta –induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer.* 31:41-46
77. Muramatsu M, Katada J, Hattori M et al: Chymase mediates mast cell-induced angiogenesis in hamster sponge granulomas. *Eur J Pharmacol*; 2000; 402:181-91
78. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, et al: Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue and tumor stroma. *J. Clin. Pathol.* 53, 626-629, 2000.
79. Narvaez D, Kamitakis J, Faure M, Claudy A: Immunohistochemical study of CD34-positive dendritic cells of human dermis. *Am J Dermatopathol* 18: 283-288, 1996
80. Norman J: The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 175:76, 1998
81. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N et al: Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res* 2004; 24:3335-42
82. Ohno S, Inagawa H, Dhar DK et al: The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 2003; 23:5015-22
83. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ: The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):50-9.
84. Papadas T, Batistatou A, Ravazoula P, Zolota V, Goumas P: S-100 positive dendritic cells and CD34 positive dendritic interstitial cells in palatine tonsils. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 258, 243-245, 2001

85. Piras F, Colombari R, Minerba L et al: The predictive value of CD8, CD4,CD68 and human antigen D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 2005;104:1246-54
86. Pitchumoni CS, Bordalo O: Evaluation of hypotheses on pathogenesis of alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 91:637, 1996
87. Polverini PJ, Leibovich SJ: Effect of macrophage depletion on growth and neovascularization of hamster buccal pouch carcinoma. *J Oral Pathol* 1987; 16:436-41
88. Ribatti D, Ennas MG, Vacca A, Farreli F et al: Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest.*2003 May;33(5):420-5
89. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997, 386:671-674
90. Saurer L, Reber P, Schaffner T, Buchler MW, Buri C, Kappeler A, Walz A, et al: Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 118:356, 2000
91. Schlosser W, Schlosser S, Ramadani M, Gansauge F, Gansauge S, Beger HG: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. 2002.
92. Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, HiroiM, Enzan H, Shuin T: The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. *Histol Histopathol* (2006) 21: 349-353
93. Sieveke MH, Thompson ML, Sporn MB, Bissel MJ: Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF β . *Science* 1990;248:1656-60
94. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI: "Stromatogenesis" and tumor progression. *Int J Surg Pathol.* 2004; 12:1-9
95. Sonin LH, Wittekind Ch: TNM classification of malignant tumours. Wiley-Liss Sixth Edition 2002
96. Suda K, Mogaki M, Oyama T, Matsumoto Y: Histopathologic and imunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis: a special emphasis on ductal obstruction and genesis of pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 85:271, 1990
97. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K et al: Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991;51:195-216
98. Swanson PE, Fitzpatrick MM, Ritter JH, Glusac EJ, Wick MR: Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens. *J Cutan Pathol* 25:153-159

99. Taipale J, Lohi J, Saarinen J et al: Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:4686-96
100. Takanami I, Takeuchi K, Naruke M: Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*.2000;88(12):2686-92
101. Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E: Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: potential clinical implications. *Med Sci Monit*. 2006 Sep;12(9):RA186-93. Review.
102. Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L: Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res* 2004;2:73-80
103. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, et al: Macrophage infiltration and its prognostic implication in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 2005;14:425-32
104. Tucker ON, Dunnenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, et al: Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Research* 59: 987-990
105. Tuna B, Yorukoglu K, Unlu M, Mungan MU, Kirkali Z: Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2006 Sep;50(3):530-4
106. Unger M, Weaver VM: The tissue microenvironment as an epigenetic tumor modifier. *Methods Mol Biol*. 2003;223:315-47. Review. No abstract available.
107. Watanabe I et al: Advanced pancreatic ductal cancer: fibrotic focus and beta-catenin expression correlate with outcome. *Pancreas*. 26: 326-333, 2003
108. Vaquero EC et al: Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways. *Gastroenterology*. 125: 1188-1202, 2003
109. Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y: Morphological studies on a vitamin-A storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissue following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat. Jpn* 58:837-858, 1982
110. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8
111. Whitcomb DC: Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 116:770, 1999

112. Yamazaki K, Eyden BP: Ultrastructural and immunohistochemical observations on intralobular fibroblasts of human breast, with observations on the CD34 antigen. *J Submicrosc Cytol Pathol* 27: 309-323, 1995
113. Yamazaki K, Eyden BP: Ultrastructural and immunohistochemical studies of stromal cells in lamina propria of human fallopian tube ampullar mucosa: the recognition of “CD34 positive reticular network” and its putative function for immune surveillance. *J Submicrosc Cytol Pathol* 28,325-337, 1996a
114. Yamazaki K, Eyden BP: Ultrastructural and immunohistochemical studies of intralobular fibroblasts in human submandibular glands: the recognition of “CD34 positive reticular network” connected by a gap junction. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1996b
115. Yamazaki K, Eyden BP: Interfollicular fibroblasts in the human thyroid gland: recognition of a CD34 positive stromal cell network communicated by gap junctions and terminated by autonomic nerve endings. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 29, 461-476,1997
116. Yano H, Kinuta M, Tateishi H et al: Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer.* 1999 May;2 (1):26-32
117. Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W: Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumor Biol.* 2004 Sep-Dec; 25 (5-6):290-5
118. Yonenaga Y, Mori A, Onodera H et al: Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology.* 2005;69(2):159-66.
119. Yoshida S et al: Pancreatic cancer stimulate pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun,* 323: 1241-1245, 2004
120. Zimnoch L, Szynaka B, Puchalski Z: Mast cells and pancreatic stellate cells in chronic pancreatitis with differently intensified fibrosis. *Hepatogastroenterology.* 2002 Jul-Aug;49(46):1135-8.

DODATEK

1. Szczegółowe zestawienie wyników badań histopatologicznych chorych na raka trzustki (str. 63-64).
2. Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych chorych na raka trzustki (str. 65-72).
3. Szczegółowe zestawienie wyników badań histopatologicznych chorych na przewlekłe zapalenia trzustki (str.73).
4. Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych chorych na przewlekłe zapalenia trzustki (str.74-77).
5. Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych grupy kontrolnej trzusek (str.78-79).
6. Metodyka wykonywania odczynów immunohistochemicznych (str.80).

1. Szczegółowe zestawienie wyników badań histopatologicznych chorych na raka trzustki.

lp	grupa	numer bad.	wiek	pleć	nasilenie stromatogenezy	tendencja do szklwienia	grading	T	N	M
1	raki	587984	69	m	2	0	2	x	x	x
2	raki	718742	67	m	2	0	2	3	0	x
3	raki	721552	68	m	2	0	1	3	1	x
4	raki	724072	49	k	1	0	2	3	1	x
5	raki	727303	74	m	1	0	1	2	1	x
6	raki	727915	43	m	1	0	3	3	1	x
7	raki	739132	63	m	2	0	1	2	0	x
8	raki	740221	71	m	3	1	1	3	0	x
9	raki	750227	54	m	3	0	1	2	0	x
10	raki	750583	50	m	2	0	2	3	0	x
11	raki	752214	63	m	2	0	2	2	0	x
12	raki	757782	63	k	3	0	1	2	0	x
13	raki	761333	51	m	3	0	1	3	1	x
14	raki	763743	53	k	2	0	2	2	1	x
15	raki	764869	85	k	2	0	1	1	0	x
16	raki	769013	60	m	3	0	1	3	0	x
17	raki	769579	62	m	3	0	1	2	1	x
18	raki	770650	70	m	3	1	2	2	1	x
19	raki	775613	62	m	3	1	2	3	1	x
20	raki	775983	56	k	3	0	1	3	1	x
21	raki	776495	72	k	3	0	2	3	1	1
22	raki	781026	61	k	2	0	1	3	0	x
23	raki	784354	57	m	2	0	2	3	0	x
24	raki	786202	68	m	2	0	3	3	0	x
25	raki	786623	60	k	3	0	1	3	1	x
26	raki	787537	61	m	2	0	2	3	0	x
27	raki	813933	62	m	2	0	2	3	1	x
28	raki	815955	50	m	1	0	3	3	1	1
29	raki	816471	71	m	2	0	2	3	0	x
30	raki	816785	56	m	2	0	2	3	1	x
31	raki	818857	53	m	2	0	2	3	1	1
32	raki	820229	69	k	2	0	1	2	0	x
33	raki	823024	65	k	3	1	1	3	1	x
34	raki	824355	68	k	3	0	1	2	0	x
35	raki	825085	70	m	1	0	3	2	1	x
36	raki	825191	76	m	2	0	2	x	x	x
37	raki	825493	44	m	2	0	2	3	0	x
38	raki	832592	91	k	3	1	1	3	0	x

lp	grupa	numer bad.	wiek	pleć	nasilenie stromatogenezy	tendencja do szklwienia	grading	T	N	M
39	raki	834084	76	k	3	0	1	2	0	x
40	raki	837358	56	m	2	0	2	3	0	x
41	raki	837450	53	k	2	0	2	2	0	x
42	raki	841490	70	k	2	0	2	2	1	x
43	raki	843016	72	m	3	0	1	3	1	x
44	raki	844620	64	m	3	1	1	3	0	x
45	raki	847435	64	m	2	0	2	3	0	x
46	raki	849465	56	m	3	0	2	2	0	x
47	raki	850587	70	k	2	0	2	3	1	x
48	raki	853136	74	m	3	0	1	2	0	x
49	raki	853399	75	m	2	0	2	3	1	x
50	raki	856824	61	m	3	0	1	2	1	x
51	raki	859392	71	m	2	0	1	3	0	x
52	raki	861626	65	m	2	0	2	x	x	x
53	raki	862503	76	k	3	0	2	3	1	x
54	raki	865977	64	m	1	0	3	3	1	x
55	raki	870548	70	k	2	0	2	2	0	x
56	raki	871790	62	k	2	0	2	3	1	x
57	raki	894829	50	k	1	0	3	2	1	x
58	raki	895473	49	k	3	1	1	1	0	x
59	raki	902053	52	k	2	0	3	2	0	x
60	raki	916187	70	k	2	0	2	2	1	x
61	raki	919193	80	k	3	0	1	3	1	x
62	raki	919893	78	m	2	0	2	3	1	x

2.Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych chorych na raka trzustki

lp	grupa	numer bad.	CD31					średnia
			1	2	3	4	5	
1	raki	587984	57	38	41	48	33	43,4
2	raki	718742	43	37	33	22	28	32,6
3	raki	721552	52	56	32	48	37	45,0
4	raki	724072	41	32	38	35	43	37,8
5	raki	727303	37	31	35	29	40	34,4
6	raki	727915	105	99	112	107	96	103,8
7	raki	739132	31	35	33	29	37	33,0
8	raki	740221	58	64	47	53	49	54,2
9	raki	750227	67	66	47	52	53	57,0
10	raki	750583	57	46	72	55	61	58,2
11	raki	752214	63	81	64	68	72	69,6
12	raki	757782	55	43	59	63	58	55,6
13	raki	761333	54	46	50	53	49	50,4
14	raki	763743	64	42	56	40	47	49,8
15	raki	764869	30	32	36	43	38	35,8
16	raki	769013	34	31	27	38	31	32,2
17	raki	769579	42	48	68	52	47	51,4
18	raki	770650	28	31	35	27	33	30,8
19	raki	775613	53	47	39	40	50	45,8
20	raki	775983	48	47	41	48	43	45,4
21	raki	776495	62	71	66	73	68	68,0
22	raki	781026	41	38	46	37	35	39,4
23	raki	784354	54	56	62	48	40	52,0
24	raki	786202	50	62	43	60	57	54,4
25	raki	786623	67	59	54	62	58	60,0
26	raki	787537	46	35	41	47	33	40,4
27	raki	813933	51	52	41	44	56	48,8
28	raki	815955	50	55	43	52	49	49,8
29	raki	816471	49	65	54	51	62	56,2
30	raki	816785	67	50	77	73	61	65,6
31	raki	818857	48	33	37	31	42	38,2
32	raki	820229	64	69	73	71	67	68,8
33	raki	823024	57	85	102	96	106	89,2
34	raki	824355	61	65	59	57	50	58,4
35	raki	825085	62	65	60	58	63	61,6
36	raki	825191	51	67	64	56	49	57,4
37	raki	825493	74	69	78	63	70	70,8
38	raki	832592	70	77	62	67	71	69,4
39	raki	834084	56	76	54	65	63	62,8
40	raki	837358	46	45	53	57	41	48,4
41	raki	837450	66	72	67	62	59	65,2
42	raki	841490	47	39	34	47	43	42,0

lp	grupa	Nr. badania	1	2	3	4	5	średnia
43	raki	843016	49	59	46	57	52	52,6
44	raki	844620	53	54	46	49	51	50,6
45	raki	847435	48	45	53	46	42	46,8
46	raki	849465	59	78	57	58	66	63,6
47	raki	850587	53	49	43	61	57	52,6
48	raki	853136	44	68	73	63	69	63,4
49	raki	853399	128	99	92	103	112	106,8
50	raki	856824	73	67	78	63	71	70,4
51	raki	859392	47	51	56	49	47	50,0
52	raki	861626	46	57	53	39	58	50,6
53	raki	862503	59	39	51	53	45	49,4
54	raki	865977	52	47	41	65	61	53,2
55	raki	870548	102	77	98	106	83	93,2
56	raki	871790	91	71	101	80	84	85,4
57	raki	894829	88	111	76	89	92	91,2
58	raki	895473	68	73	68	75	71	71,0
59	raki	902053	58	55	53	49	59	54,8
60	raki	916187	52	50	35	46	38	44,2
61	raki	919193	66	69	70	61	65	66,2
62	raki	919893	59	72	67	65	62	65,0

lp	grupa	numer bad.	CD68					średnia
			1	2	3	4	5	
1	raki	587984	30	59	44	57	26	43,2
2	raki	718742	32	54	99	59	46	58,0
3	raki	721552	34	26	72	29	36	39,4
4	raki	724072	46	75	82	96	65	72,8
5	raki	727303	42	64	56	46	57	53,0
6	raki	727915	90	98	80	88	77	86,6
7	raki	739132	34	48	35	32	26	35,0
8	raki	740221	86	106	46	76	130	88,8
9	raki	750227	55	41	39	42	47	44,8
10	raki	750583	42	56	51	32	37	43,6
11	raki	752214	58	64	40	45	43	50,0
12	raki	757782	86	72	76	74	70	75,6
13	raki	761333	62	58	54	49	58	56,2
14	raki	763743	59	54	44	51	73	56,2
15	raki	764869	68	66	64	84	59	68,2
16	raki	769013	94	76	42	54	82	69,6
17	raki	769579	71	52	39	36	62	52,0
18	raki	770650	67	78	43	40	42	54,0
19	raki	775613	74	46	73	67	96	71,2
20	raki	775983	82	64	74	63	59	68,4
21	raki	776495	63	130	94	112	62	92,2
22	raki	781026	68	59	44	53	50	54,8
23	raki	784354	60	64	58	72	53	61,4
24	raki	786202	95	86	51	67	66	73,0
25	raki	786623	97	76	49	37	75	66,8
26	raki	787537	102	77	49	37	75	68,0
27	raki	813933	42	53	56	38	62	50,2
28	raki	815955	39	58	61	38	44	48,0
29	raki	816471	52	96	93	54	67	72,4
30	raki	816785	48	77	68	72	70	67,0
31	raki	818857	57	70	33	49	57	53,2
32	raki	820229	27	60	81	44	66	55,6
33	raki	823024	80	89	112	92	90	92,6
34	raki	824355	58	65	56	64	53	59,2
35	raki	825085	75	67	70	61	82	71,0
36	raki	825191	69	66	54	57	64	62,0
37	raki	825493	64	117	69	78	82	82,0
38	raki	832592	76	92	70	71	87	79,2
39	raki	834084	77	65	43	65	59	61,8
40	raki	837358	77	23	29	38	46	42,6
41	raki	837450	94	77	66	84	72	78,6
42	raki	841490	75	89	72	70	84	78,0
43	raki	843016	46	49	53	58	41	49,4
44	raki	844620	75	53	80	53	79	68,0
45	raki	847435	70	85	116	96	93	92,0
46	raki	849465	76	97	59	71	87	78,0
47	raki	850587	70	75	49	70	61	65,0
48	raki	853136	95	60	44	61	72	66,4

lp	grupa	Nr. badania	1	2	3	4	5	średnia
49	raki	853399	55	42	57	50	51	51,0
50	raki	856824	63	112	56	82	76	77,8
51	raki	859392	71	109	90	78	106	90,8
52	raki	861626	67	72	51	78	58	65,2
53	raki	862503	70	75	63	62	74	68,8
54	raki	865977	42	64	67	64	50	57,4
55	raki	870548	63	62	78	61	74	67,6
56	raki	871790	55	49	33	51	40	45,6
57	raki	894829	73	83	107	102	69	86,8
58	raki	895473	67	72	73	62	81	71,0
59	raki	902053	87	94	91	81	101	90,8
60	raki	916187	106	85	79	81	97	89,6
61	raki	919193	53	65	47	54	58	55,4
62	raki	919893	47	106	68	81	52	70,8

lp	grupa	numer bad.	Giemsa					średnia
			1	2	3	4	5	
1	raki	587984	3	8	12	7	9	7,8
2	raki	718742	5	3	3	4	6	4,2
3	raki	721552	9	12	11	14	9	11,0
4	raki	724072	16	12	9	11	3	10,2
5	raki	727303	12	16	1	8	10	9,4
6	raki	727915	10	9	8	14	8	9,8
7	raki	739132	7	3	9	4	8	6,2
8	raki	740221	14	13	9	12	13	12,2
9	raki	750227	5	12	11	10	8	9,2
10	raki	750583	5	3	12	9	5	6,8
11	raki	752214	5	4	12	7	7	7,0
12	raki	757782	21	16	19	23	14	18,6
13	raki	761333	13	11	18	12	9	12,6
14	raki	763743	12	16	14	13	8	12,6
15	raki	764869	27	18	23	22	15	21,0
16	raki	769013	5	5	6	9	3	5,6
17	raki	769579	16	17	13	9	14	13,8
18	raki	770650	11	17	15	17	13	14,6
19	raki	775613	24	32	19	32	14	24,2
20	raki	775983	17	11	11	10	15	12,8
21	raki	776495	6	3	23	12	9	10,6
22	raki	781026	9	6	5	7	3	6,0
23	raki	784354	3	6	6	5	4	4,8
24	raki	786202	3	4	9	7	5	5,6
25	raki	786623	12	11	11	13	12	11,8
26	raki	787537	5	10	11	10	3	7,8
27	raki	813933	15	7	12	13	8	11,0
28	raki	815955	11	14	12	13	15	13,0
29	raki	816471	11	7	9	9	8	8,8
30	raki	816785	10	22	8	14	15	13,8
31	raki	818857	9	25	8	10	13	13,0
32	raki	820229	12	13	5	7	14	10,2
33	raki	823024	6	3	11	9	2	6,2
34	raki	824355	5	27	3	13	20	13,6
35	raki	825085	4	14	13	9	12	10,4
36	raki	825191	23	8	17	12	18	15,6
37	raki	825493	10	8	7	9	12	9,2
38	raki	832592	16	15	24	16	21	18,4
39	raki	834084	12	10	10	11	7	10,0
40	raki	837358	10	11	8	9	7	9,0
41	raki	837450	6	7	12	10	10	9,0
42	raki	841490	10	13	9	7	9	9,6
43	raki	843016	8	10	9	9	6	8,4
44	raki	844620	10	8	9	7	12	9,2
45	raki	847435	13	5	12	11	3	8,8
46	raki	849465	8	13	16	14	5	11,2

Lp	grupa	Nr. badania	1	2	3	4	5	średnia
47	raki	850587	2	6	5	3	8	4,8
48	raki	853136	12	25	21	23	14	19,0
49	raki	853399	16	13	18	7	8	12,4
50	raki	856824	14	17	5	9	11	11,2
51	raki	859392	4	5	4	3	2	3,6
52	raki	861626	12	8	14	12	7	10,6
53	raki	862503	12	11	12	13	11	11,8
54	raki	865977	10	17	12	5	3	9,4
55	raki	870548	2	3	5	4	1	3,0
56	raki	871790	13	7	12	11	9	10,4
57	raki	894829	6	5	5	4	3	4,6
58	raki	895473	4	1	3	3	2	2,6
59	raki	902053	39	37	34	32	28	34,0
60	raki	916187	30	10	14	22	14	18,0
61	raki	919193	14	16	13	15	11	13,8
62	raki	919893	17	18	14	11	14	14,8

lp	grupa	numer bad.	CD34 stroma	ASMA stroma	LCA
1	raki	587984	0	4	3
2	raki	718742	1	4	3
3	raki	721552	0	4	2
4	raki	724072	0	4	1
5	raki	727303	0	3	2
6	raki	727915	0	4	3
7	raki	739132	1	3	3
8	raki	740221	0	4	2
9	raki	750227	0	4	2
10	raki	750583	0	4	3
11	raki	752214	0	4	2
12	raki	757782	0	4	3
13	raki	761333	0	3	3
14	raki	763743	0	4	3
15	raki	764869	0	4	3
16	raki	769013	3	4	2
17	raki	769579	3	3	2
18	raki	770650	2	3	2
19	raki	775613	3	3	3
20	raki	775983	0	4	2
21	raki	776495	0	4	3
22	raki	781026	0	4	2
23	raki	784354	2	4	3
24	raki	786202	0	3	2
25	raki	786623	0	4	2
26	raki	787537	0	4	3
27	raki	813933	0	4	2
28	raki	815955	0	4	2
29	raki	816471	1	4	3
30	raki	816785	0	4	3
31	raki	818857	1	4	3
32	raki	820229	0	4	3
33	raki	823024	0	4	3
34	raki	824355	1	3	2
35	raki	825085	0	3	3
36	raki	825191	0	3	3
37	raki	825493	2	4	3
38	raki	832592	0	4	3
39	raki	834084	0	2	2
40	raki	837358	0	3	2
41	raki	837450	0	4	4
42	raki	841490	0	4	3
43	raki	843016	0	4	2
44	raki	844620	0	4	2
45	raki	847435	0	4	2
46	raki	849465	0	4	2
47	raki	850587	0	3	2
48	raki	853136	0	3	2

lp	grupa	nr. badania	CD34	ASMA	LCA
49	raki	853399	0	3	4
50	raki	856824	0	3	3
51	raki	859392	0	4	2
52	raki	861626	0	4	2
53	raki	862503	0	4	2
54	raki	865977	0	4	2
55	raki	870548	0	4	1
56	raki	871790	0	4	2
57	raki	894829	0	4	3
58	raki	895473	0	3	2
59	raki	902053	0	3	3
60	raki	916187	0	4	3
61	raki	919193	0	4	3
62	raki	919893	0	4	3

3. Szczegółowe zestawienie badań histopatologicznych chorych na przewlekłe zapalenia trzustki.

lp	grupa	numer bad.	wiek	płeć	nasilenie stromatogenezy	typ włóknienia		tendencja do szkliwienia
						inter	intra	
1	zapal	718693	49	m	3	3	2	1
2	zapal	720601	50	m	3	3	2	1
3	zapal	726530	45	m	3	3	1	1
4	zapal	728259	44	m	1	1	0	0
5	zapal	739249	45	m	3	3	3	1
6	zapal	746960	69	k	1	1	1	0
7	zapal	747683	34	m	2	2	1	1
8	zapal	749794	29	m	3	3	1	1
9	zapal	750232	41	m	2	2	1	0
10	zapal	751211	44	m	2	2	1	0
11	zapal	756393	35	m	2	2	1	1
12	zapal	758545	39	m	3	3	1	1
13	zapal	758921	47	m	2	2	1	1
14	zapal	761320	51	m	3	3	1	1
15	zapal	763890	43	m	3	3	1	1
16	zapal	775853	47	m	2	2	1	0
17	zapal	781531	19	m	3	3	2	1
18	zapal	782739	38	m	2	2	2	0
19	zapal	784759	45	m	1	1	0	0
20	zapal	790622	57	m	3	3	2	1
21	zapal	791722	59	k	2	2	1	0
22	zapal	792401	48	m	2	2	1	0
23	zapal	796976	47	k	3	3	2	1
24	zapal	802066	49	m	3	3	1	1
25	zapal	803441	65	k	3	3	2	1
26	zapal	815282	33	m	3	3	2	1
27	zapal	815562	40	k	2	2	1	1
28	zapal	817226	51	m	2	2	1	1
29	zapal	818306	50	m	2	2	1	0
30	zapal	820158	39	m	3	3	1	1
31	zapal	821517	64	m	1	1	0	0
32	zapal	824927	77	m	3	3	3	1
33	zapal	830328	52	m	3	3	1	1
34	zapal	832323	42	m	3	3	2	1
35	zapal	833091	52	m	3	3	2	1
36	zapal	841338	51	k	3	3	2	1
37	zapal	862034	81	k	3	3	3	1
38	zapal	867050	35	k	3	3	1	1
39	zapal	873345	70	k	3	3	3	1
40	zapal	878145	60	m	2	2	1	0
41	zapal	916347	52	k	3	3	2	1
42	zapal	944853	71	k	3	3	1	1
43	zapal	947872	38	m	3	3	2	1

4. Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych chorych na przewlekłe zapalenie trzustki.

lp	grupa	numer bad.	CD31					średnia
			1	2	3	4	5	
1	zapal	718693	46	29	50	30	38	38,6
2	zapal	720601	51	42	53	49	44	47,8
3	zapal	726530	27	46	47	31	42	38,6
4	zapal	728259	41	25	33	38	51	37,6
5	zapal	739249	16	11	25	33	38	24,6
6	zapal	746960	27	24	26	23	31	26,2
7	zapal	747683	29	26	33	38	24	30,0
8	zapal	749794	98	46	30	32	41	49,4
9	zapal	750232	49	61	37	54	43	48,8
10	zapal	751211	29	21	24	17	23	22,8
11	zapal	756393	28	27	32	25	27	27,8
12	zapal	758545	48	36	28	33	30	35,0
13	zapal	758921	23	25	18	31	28	25,0
14	zapal	761320	19	23	28	26	31	25,4
15	zapal	763890	27	32	44	35	38	35,2
16	zapal	775853	41	48	37	48	35	41,8
17	zapal	781531	44	31	54	28	34	38,2
18	zapal	782739	30	54	37	43	48	42,4
19	zapal	784759	25	33	21	28	30	27,4
20	zapal	790622	86	45	41	57	43	54,4
21	zapal	791722	36	55	65	48	51	51,0
22	zapal	792401	105	76	82	63	53	75,8
23	zapal	796976	28	30	33	27	31	29,8
24	zapal	802066	22	26	25	31	24	25,6
25	zapal	803441	50	32	58	55	48	48,6
26	zapal	815282	63	50	69	60	61	60,6
27	zapal	815562	74	71	58	67	63	66,6
28	zapal	817226	69	76	54	72	66	67,4
29	zapal	818306	64	56	41	49	57	53,4
30	zapal	820158	48	41	38	51	46	44,8
31	zapal	821517	102	84	96	78	97	91,4
32	zapal	824927	31	63	50	44	52	48,0
33	zapal	830328	58	66	54	52	62	58,4
34	zapal	832323	78	76	69	72	61	71,2
35	zapal	833091	37	46	55	48	43	45,8
36	zapal	841338	46	64	45	52	57	52,8
37	zapal	862034	32	28	36	41	25	32,4
38	zapal	867050	77	58	62	45	62	60,8
39	zapal	873345	36	29	32	38	33	33,6
40	zapal	878145	22	25	32	27	31	27,4
41	zapal	916347	77	64	72	75	69	71,4
42	zapal	944853	39	75	55	62	58	57,8
43	zapal	947872	52	71	60	58	63	60,8

lp	grupa	numer bad.	CD68					średnia
			1	2	3	4	5	
1	zapal	718693	43	36	59	44	53	47,0
2	zapal	720601	13	46	45	41	38	36,6
3	zapal	726530	37	25	39	31	32	32,8
4	zapal	728259	26	23	18	25	20	22,4
5	zapal	739249	32	18	30	30	24	26,8
6	zapal	746960	24	25	44	38	25	31,2
7	zapal	747683	105	98	55	78	82	83,6
8	zapal	749794	19	17	22	21	16	19,0
9	zapal	750232	83	91	102	105	87	93,6
10	zapal	751211	16	21	18	24	19	19,6
11	zapal	756393	73	32	52	46	63	53,2
12	zapal	758545	12	19	28	27	17	20,6
13	zapal	758921	48	40	26	33	28	35,0
14	zapal	761320	28	25	24	31	20	25,6
15	zapal	763890	21	32	18	25	28	24,8
16	zapal	775853	25	21	26	27	32	26,2
17	zapal	781531	43	49	37	44	53	45,2
18	zapal	782739	14	44	18	37	52	33,0
19	zapal	784759	26	25	17	28	31	25,4
20	zapal	790622	37	49	58	43	36	44,6
21	zapal	791722	4	6	3	9	7	5,8
22	zapal	792401	75	70	58	68	52	64,6
23	zapal	796976	13	5	12	16	10	11,2
24	zapal	802066	25	24	16	19	26	22,0
25	zapal	803441	8	11	3	9	5	7,2
26	zapal	815282	48	45	38	43	37	42,2
27	zapal	815562	14	43	28	34	29	29,6
28	zapal	817226	21	15	24	20	27	21,4
29	zapal	818306	44	12	21	37	26	28,0
30	zapal	820158	61	74	66	59	72	66,4
31	zapal	821517	29	32	22	37	20	28,0
32	zapal	824927	42	60	37	58	43	48,0
33	zapal	830328	41	9	27	19	31	25,4
34	zapal	832323	26	8	2	17	14	13,4
35	zapal	833091	23	25	33	27	33	28,2
36	zapal	841338	22	23	33	27	31	27,2
37	zapal	862034	47	40	46	45	61	47,8
38	zapal	867050	59	49	58	48	52	53,2
39	zapal	873345	35	23	27	33	25	28,6
40	zapal	878145	39	28	21	25	27	28,0
41	zapal	916347	29	18	24	31	30	26,4
42	zapal	944853	39	29	47	35	37	37,4
43	zapal	947872	31	33	29	42	23	31,6

lp	grupa	numer bad.	Giemsa					średnia
			1	2	3	4	5	
1	zapal	718693	10	10	7	8	11	9,2
2	zapal	720601	8	9	10	10	9	9,2
3	zapal	726530	12	11	14	12	13	12,4
4	zapal	728259	4	5	8	7	6	6,0
5	zapal	739249	21	14	18	15	20	17,6
6	zapal	746960	10	9	6	7	7	7,8
7	zapal	747683	21	12	10	15	13	14,2
8	zapal	749794	14	21	22	21	16	18,8
9	zapal	750232	9	9	9	8	12	9,4
10	zapal	751211	4	3	5	4	1	3,4
11	zapal	756393	3	10	9	2	7	6,2
12	zapal	758545	14	9	10	10	11	10,8
13	zapal	758921	14	14	10	8	9	11,0
14	zapal	761320	6	6	9	7	3	6,2
15	zapal	763890	25	33	25	24	32	27,8
16	zapal	775853	14	15	13	17	12	14,2
17	zapal	781531	13	16	8	10	11	11,6
18	zapal	782739	9	8	8	7	9	8,2
19	zapal	784759	3	2	4	8	3	4,0
20	zapal	790622	1	1	1	2	0	1,0
21	zapal	791722	16	14	28	17	23	19,6
22	zapal	792401	6	6	4	7	2	5,0
23	zapal	796976	5	5	4	4	3	4,2
24	zapal	802066	11	7	6	9	7	8,0
25	zapal	803441	1	2	5	3	4	3,0
26	zapal	815282	15	31	32	28	21	25,4
27	zapal	815562	8	7	7	7	6	7,0
28	zapal	817226	5	7	6	8	2	5,6
29	zapal	818306	10	13	22	7	14	13,2
30	zapal	820158	10	8	5	7	9	7,8
31	zapal	821517	16	13	16	12	18	15,0
32	zapal	824927	4	8	7	9	3	6,2
33	zapal	830328	16	13	9	11	12	12,2
34	zapal	832323	9	8	17	13	10	11,4
35	zapal	833091	9	6	3	5	8	6,2
36	zapal	841338	18	10	12	14	13	13,4
37	zapal	862034	11	18	12	16	14	14,2
38	zapal	867050	5	4	7	8	2	5,2
39	zapal	873345	18	13	12	11	10	12,8
40	zapal	878145	9	7	4	1	12	6,6
41	zapal	916347	6	4	7	5	3	5,0
42	zapal	944853	6	2	3	4	7	4,4
43	zapal	947872	7	3	8	8	4	6,0

lp	grupa	numer bad.	CD34 stroma	ASMA stroma	LCA
1	zapal	718693	4	2	3
2	zapal	720601	4	2	3
3	zapal	726530	4	4	2
4	zapal	728259	4	1	1
5	zapal	739249	4	3	1
6	zapal	746960	2	4	2
7	zapal	747683	4	1	3
8	zapal	749794	4	3	3
9	zapal	750232	2	3	4
10	zapal	751211	2	3	1
11	zapal	756393	4	1	3
12	zapal	758545	3	3	3
13	zapal	758921	3	3	2
14	zapal	761320	4	1	2
15	zapal	763890	1	2	4
16	zapal	775853	4	3	3
17	zapal	781531	1	3	4
18	zapal	782739	4	2	3
19	zapal	784759	4	2	2
20	zapal	790622	4	1	3
21	zapal	791722	3	1	2
22	zapal	792401	3	2	4
23	zapal	796976	3	3	3
24	zapal	802066	2	3	3
25	zapal	803441	2	3	2
26	zapal	815282	4	3	3
27	zapal	815562	3	1	2
28	zapal	817226	4	2	3
29	zapal	818306	4	2	2
30	zapal	820158	3	2	3
31	zapal	821517	3	1	1
32	zapal	824927	3	2	2
33	zapal	830328	4	2	3
34	zapal	832323	3	3	3
35	zapal	833091	4	2	3
36	zapal	841338	4	2	3
37	zapal	862034	3	2	3
38	zapal	867050	2	3	2
39	zapal	873345	4	3	2
40	zapal	878145	3	3	3
41	zapal	916347	3	3	2
42	zapal	944853	3	1	2
43	zapal	947872	2	3	3

5. Szczegółowe zestawienie wyników badań immunohistochemicznych i histochemicznych grupy kontrolnej trzustek.

lp	grupa	numer bad.	CD31					średnia
			1	2	3	4	5	
1	kontr.	45705	34	42	40	35	38	37,8
2	kontr.	45698	48	53	47	46	42	47,2
3	kontr.	45813	39	33	28	35	37	34,4
4	kontr.	45593	37	29	33	31	36	33,2
5	kontr.	V	48	51	51	52	39	48,2
6	kontr.	45692	35	26	38	31	29	31,8
7	kontr.	45669	37	48	43	39	41	41,6
8	kontr.	45663	59	43	61	52	48	52,6
9	kontr.	45819	41	37	33	37	32	36,0
10	kontr.	45715	53	44	52	48	49	49,2
11	kontr.	45652	39	35	48	37	39	39,6
12	kontr.	45592	51	49	43	41	51	47,0
13	kontr.	45650	52	48	49	47	45	48,2
14	kontr.	45808	51	45	57	56	42	40,0
15	kontr.	45836	52	48	41	49	51	48,2
16	kontr.	45685	42	51	49	45	56	44,8
17	kontr.	45611	58	51	47	41	43	48,0
18	kontr.	I	33	39	41	52	46	42,2
19	kontr.	45552	53	58	51	56	47	53,0
20	kontr.	45649	42	32	51	43	54	44,4

lp	grupa	numer bad.	CD68					średnia
			1	2	3	4	5	
1	kontr.	45705	41	34	23	33	36	33,4
2	kontr.	45698	7	9	10	8	9	8,6
3	kontr.	45813	13	10	8	9	11	10,2
4	kontr.	45593	22	28	26	24	27	25,4
5	kontr.	V	28	25	22	29	31	27,0
6	kontr.	45692	16	22	28	26	19	22,2
7	kontr.	45669	16	18	22	27	28	22,2
8	kontr.	45663	25	21	20	18	27	22,2
9	kontr.	45819	24	15	26	19	23	21,4
10	kontr.	45715	36	24	26	24	31	28,2
11	kontr.	45652	28	24	32	24	29	27,4
12	kontr.	45592	44	38	37	35	33	37,4
13	kontr.	45650	31	29	26	22	25	26,6
14	kontr.	45808	24	31	33	36	20	28,8
15	kontr.	45836	38	41	43	35	39	39,2
16	kontr.	45685	22	24	18	21	25	22,0
17	kontr.	45611	10	9	11	13	7	10,0
18	kontr.	I	26	22	28	22	18	23,2
19	kontr.	45552	14	10	12	18	15	13,8
20	kontr.	45649	49	31	38	34	29	36,2

lp	grupa	numer bad.	Giemsa					średnia
			1	2	3	4	5	
1	kontr.	45705	1	1	2	2	1	1,4
2	kontr.	45698	3	0	1	2	1	1,4
3	kontr.	45813	0	1	0	1	2	0,8
4	kontr.	45593	0	0	0	1	0	0,2
5	kontr.	V	1	1	0	2	0	0,8
6	kontr.	45692	1	0	0	1	0	0,4
7	kontr.	45669	3	3	1	1	2	2,0
8	kontr.	45663	6	6	4	5	2	4,6
9	kontr.	45819	1	1	0	1	1	0,8
10	kontr.	45715	3	1	2	2	1	1,8
11	kontr.	45652	0	0	2	0	1	0,6
12	kontr.	45592	0	0	1	1	1	0,6
13	kontr.	45650	0	0	2	1	1	0,8
14	kontr.	45808	1	0	0	0	1	0,4
15	kontr.	45836	0	0	0	2	0	0,4
16	kontr.	45685	1	1	0	0	2	0,8
17	kontr.	45611	1	3	1	0	1	1,2
18	kontr.	I	0	0	1	1	2	0,8
19	kontr.	45552	22	10	14	17	20	16,6
20	kontr.	45649	0	0	0	2	1	0,6

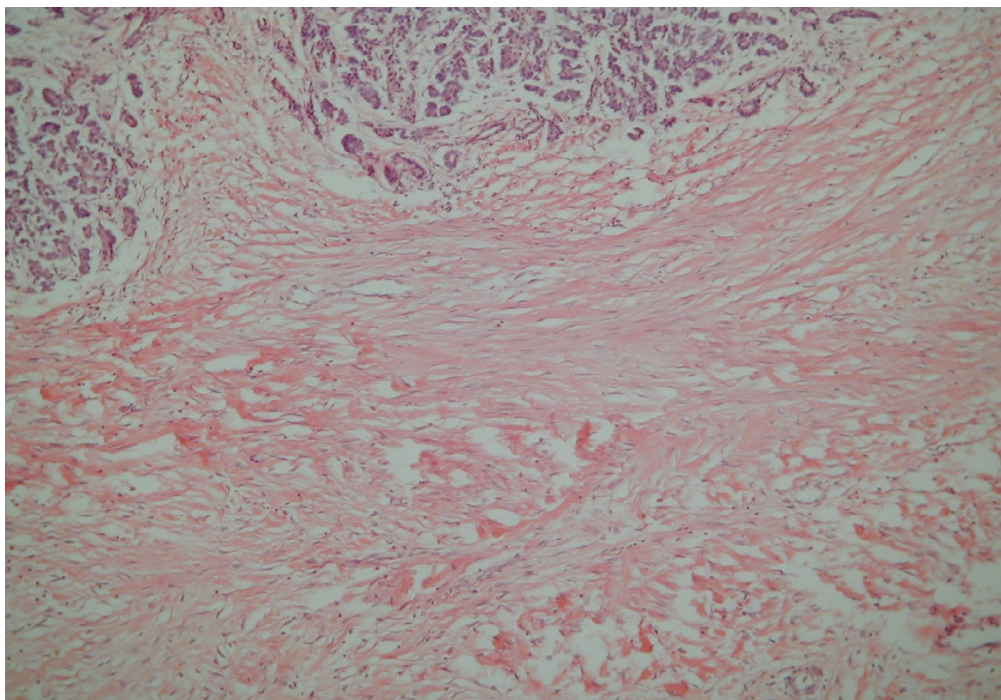
lp	grupa	numer bad.	CD34 stroma	ASMA stroma	LCA	nasilenie stromatogenezy
1	kontr.	45705	1	1	2	1
2	kontr.	45698	1	1	1	0
3	kontr.	45813	0	1	0	0
4	kontr.	45593	0	0	0	0
5	kontr.	V	1	1	1	0
6	kontr.	45692	1	1	1	0
7	kontr.	45669	0	1	0	0
8	kontr.	45663	1	1	1	0
9	kontr.	45819	0	1	1	0
10	kontr.	45715	0	1	1	0
11	kontr.	45652	1	1	1	0
12	kontr.	45592	1	1	1	0
13	kontr.	45650	1	1	1	0
14	kontr.	45808	1	1	1	0
15	kontr.	45836	1	1	1	0
16	kontr.	45685	1	1	0	0
17	kontr.	45611	1	1	1	0
18	kontr.	I	1	1	1	0
19	kontr.	45552	1	1	2	1
20	kontr.	45649	1	1	1	0

Metodyka wykonywania odczynów immunohistochemicznych (przeciwciała: B1-C5, JC70A, KP1, 2B11 + PD7/26, 1A4, Dako Cytomation)

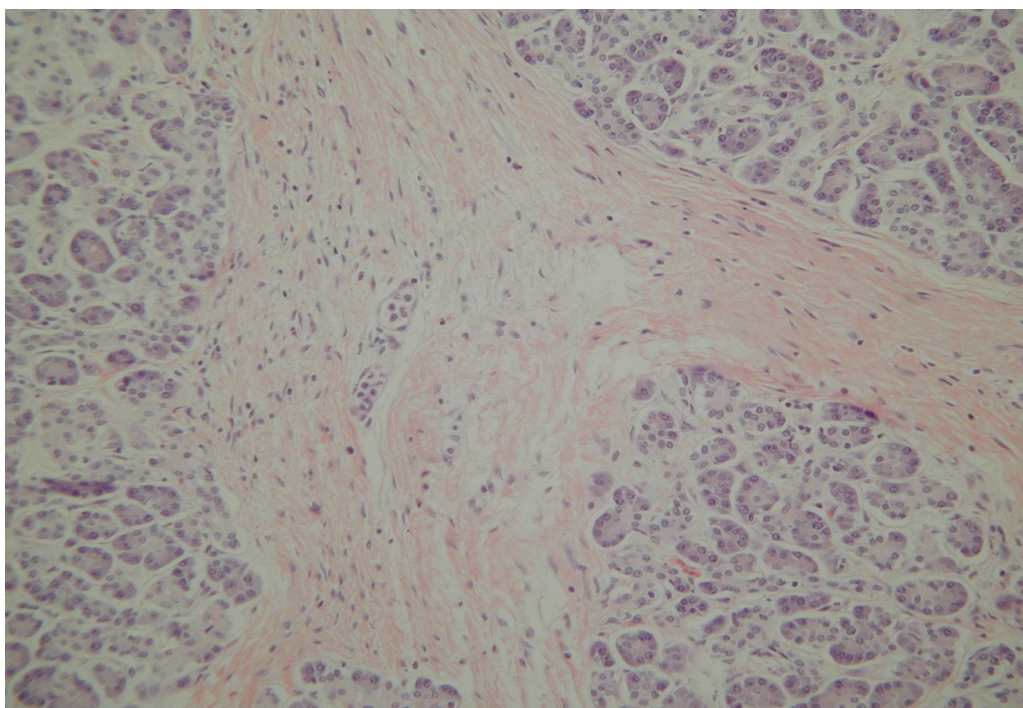
1. Przygotowanie skrawków: odparafinowanie, uwodnienie.
2. Odsłanianie antygenów przez podgrzewanie w temperaturze 95°C przez 20 minut w 10 mM buforze cytrynianowym , pH 6,0.
3. Trzykrotne płukanie w wodzie destylowanej przez 2 minuty.
4. Inkubacja w 0,3% roztworze wody utlenionej z metanolem przez 30 minut w temperaturze 20°C (blokada endogennej peroksydazy).
5. Płukanie w roztworze soli zbuforowanej (PBS).
6. Inkubacja w 20% roztworze surowicy świńskiej (Dako- X0901).
7. Usunięcie surowicy świńskiej bez płukania.
8. Nałożenie przeciwciała pierwotnego (rozcieńczenia: B1-C5 – 1:25, JC70A – 1:50, KP1 – 1:50, 2B11+PD7/26 – 1:50, 1A4 – 1:200). Inkubacja w temperaturze 4°C przez 20 godzin.
9. Płukanie w roztworze PBS.
10. Nałożenie przeciwciał wtórnych (anty-mysie i anty-królicze biotynylowane przeciwciała w roztworze buforu PBS, Dako K675). Inkubacja przez 30 minut w temperaturze 20°C.
11. Płukanie w roztworze PBS.
12. Inkubacja w roztworze streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową w roztworze buforu PBS w temperaturze 20°C przez 30 minut.

13. Naniesienie chromogenu: 10mg% roztwór diaminobenzydyny w buforze Tris-HCl (100 ml) 30% roztworze wody utlenionej (75µl). Inkubacja w temperaturze 20°C przez 10 minut.
14. Płukanie w wodzie destylowanej przez 5 minut.
15. Barwienie hematoksyliną Harrisa przez 5-8 sekund.
16. Płukanie w wodzie destylowanej przez 5 minut.
17. Kilkukrotne zanurzanie w 37mM roztworze wody amoniakalnej.
18. Płukanie w wodzie destylowanej przez 4 minuty.
19. Odwodnienie, prześwietlenie, pokrycie preparatu balsamem kanadyjskim, zamknięcie szkiełkiem nakrywkowym.

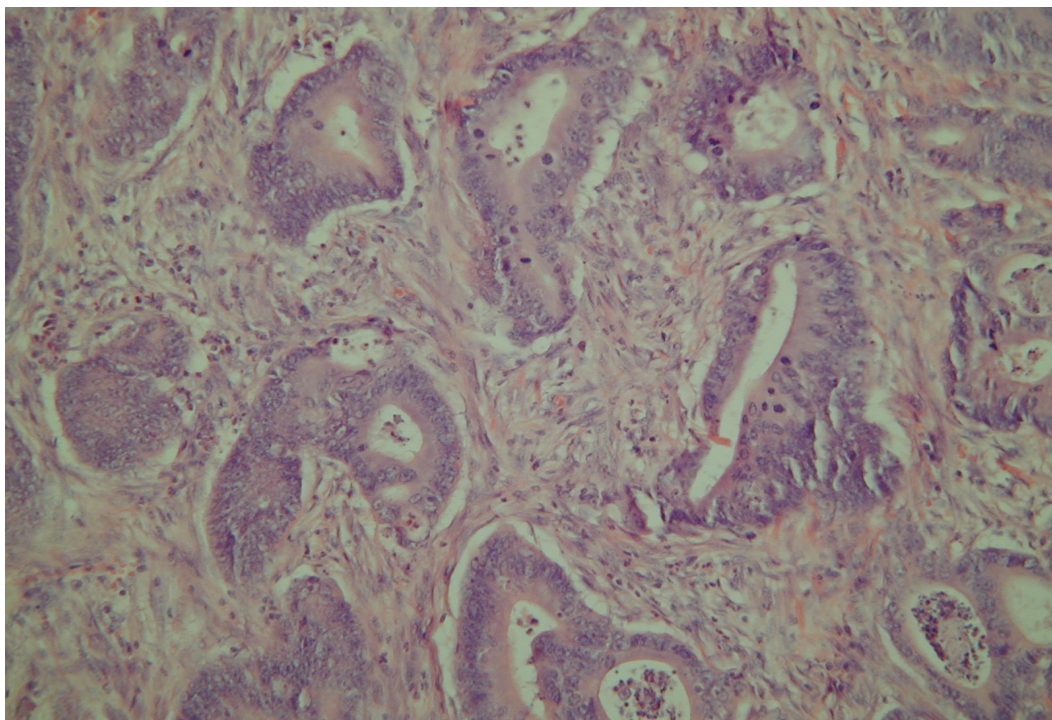
Kontrola negatywna: postępowanie jak powyżej z nałożeniem roztworu surowicy mysiej uzyskanej od nieimmunizowanego zwierzęcia (X0910, Dako), rozcieńczonej w stosunku 1:25 w 4% roztworze surowicy wołowej w buforze PBS w miejsce przeciwciała pierwotnego.



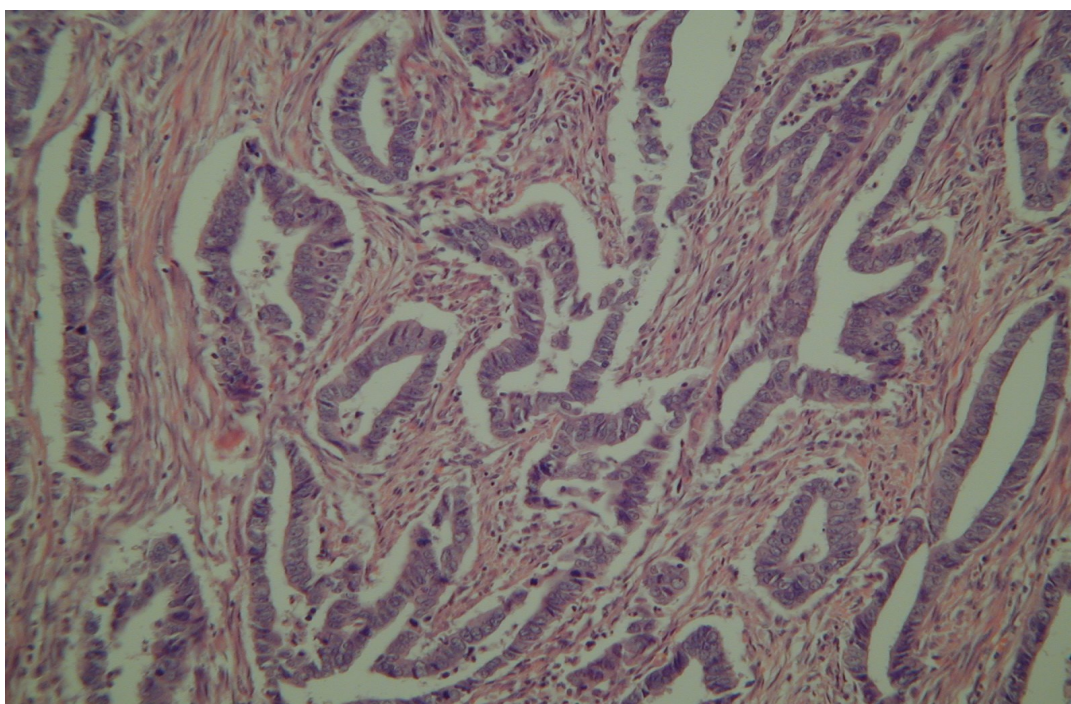
Fot.1. Podścielisko przewlekłego zapalenia trzustki. Zwraca uwagę obecność silnie skolagenizowanej tkanki łącznej w centralnej części obszaru z nasiloną stromatogenezą (H+E, x100)



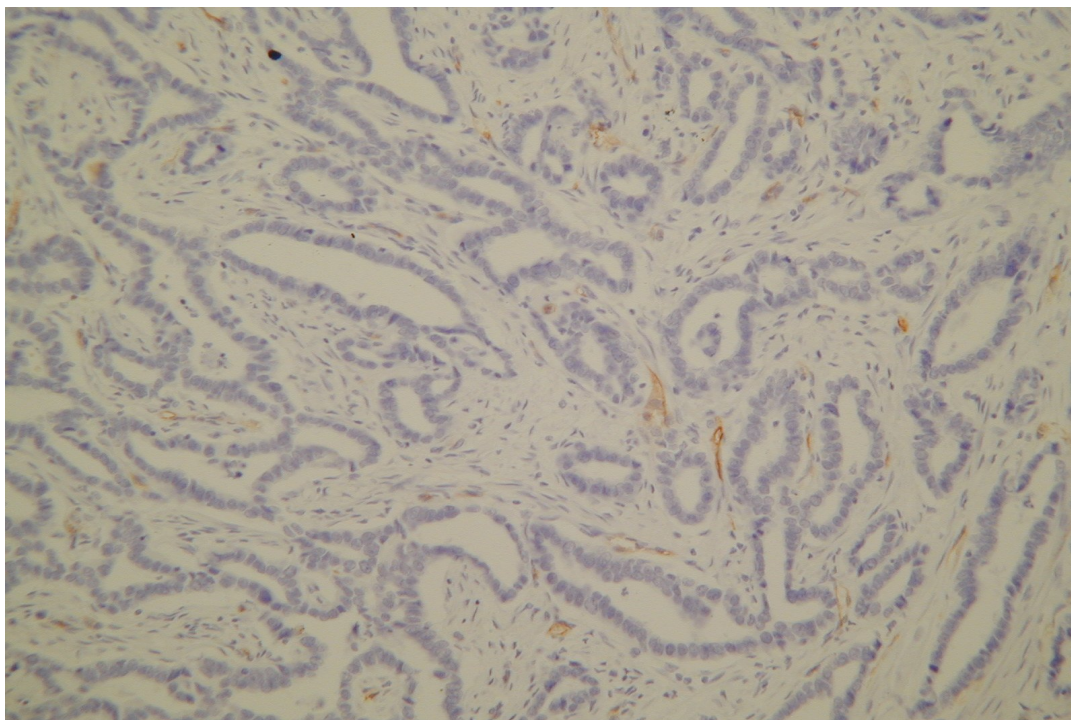
Fot.2. Podścielisko przewlekłego zapalenia trzustki. W porównaniu z podścieliskiem raka żrąb jest ubogokomórkowy (H+E, x200)



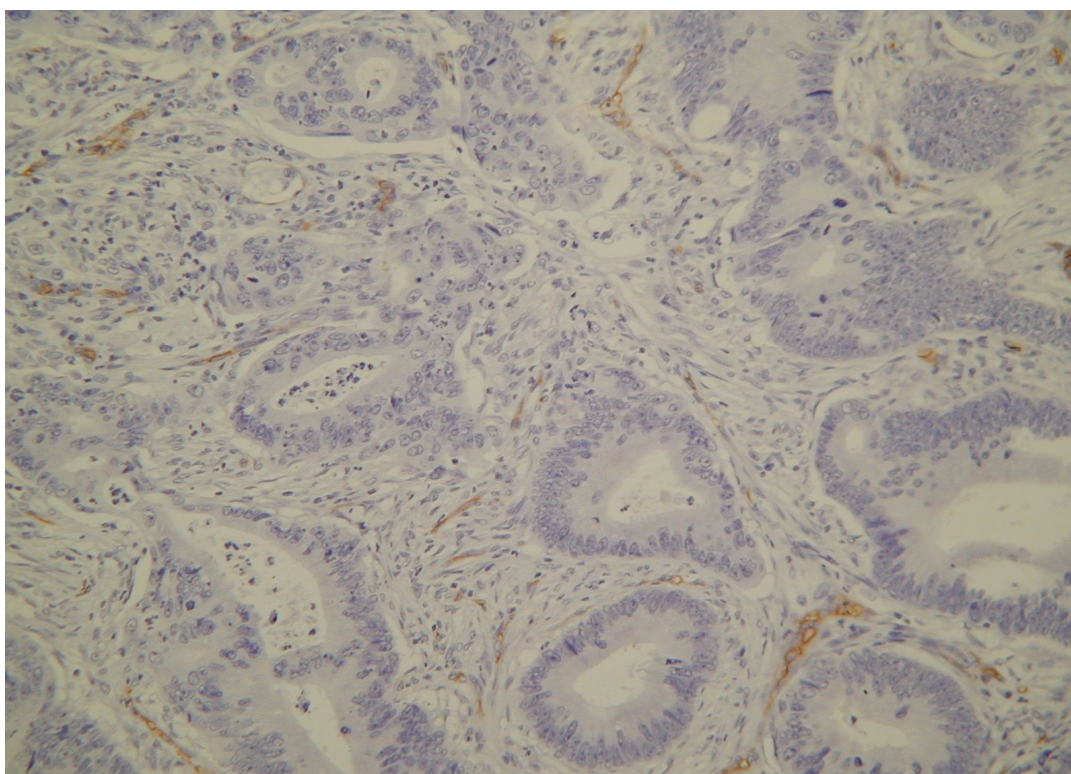
Fot.3. Podścielisko raka przewodowego trzustki, bogatokomórkowe bez obszarów wyraźnej kolagenizacji zrębu (H+E, x200).



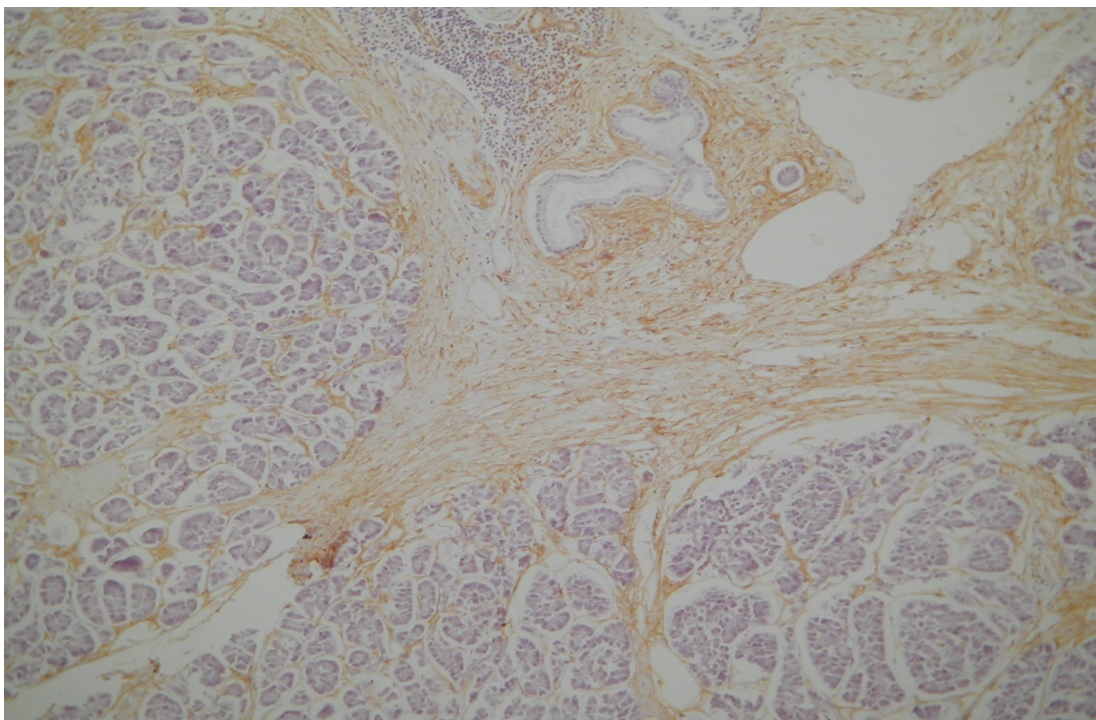
Fot.4. Inny przypadek raka trzustki z bogatokomórkowym podścieliskiem i miernie zaznaczoną kolagenizacją zrębu (H+E, x200).



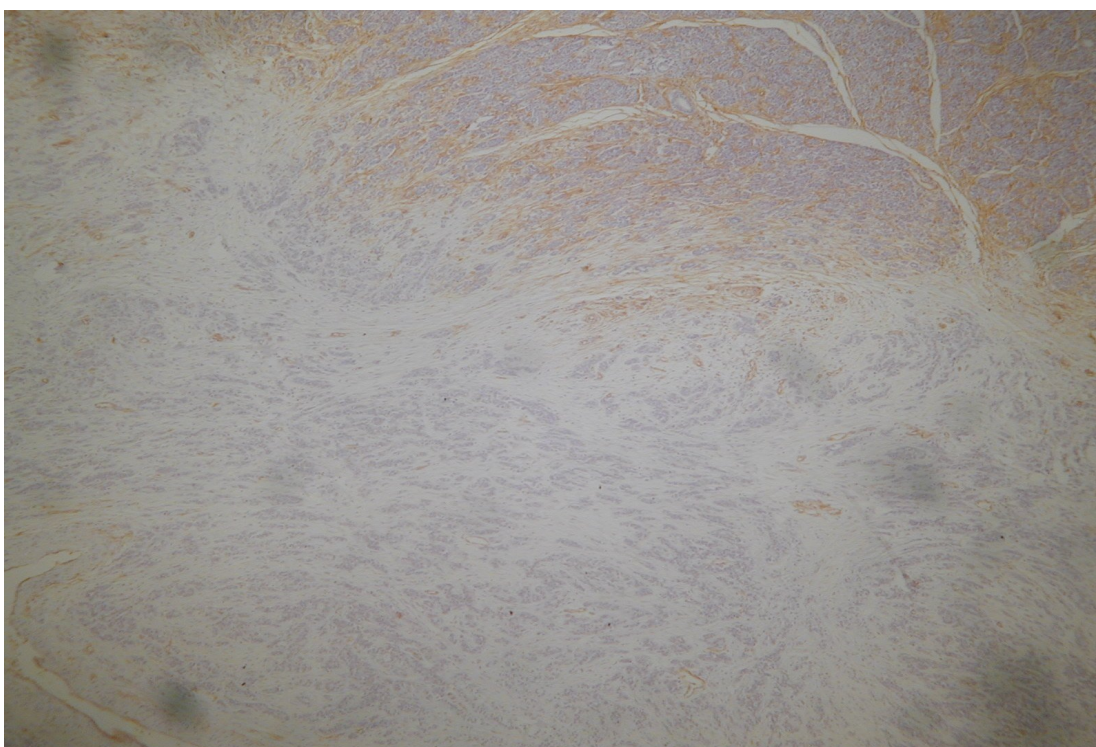
Fot.5. Brak komórek CD34+ w podścielisku raka trzustki. Wewnętrzna kontrolę poprawności odczynu stanowią wybarwione naczynia mikrokrążenia (CD34, x200).



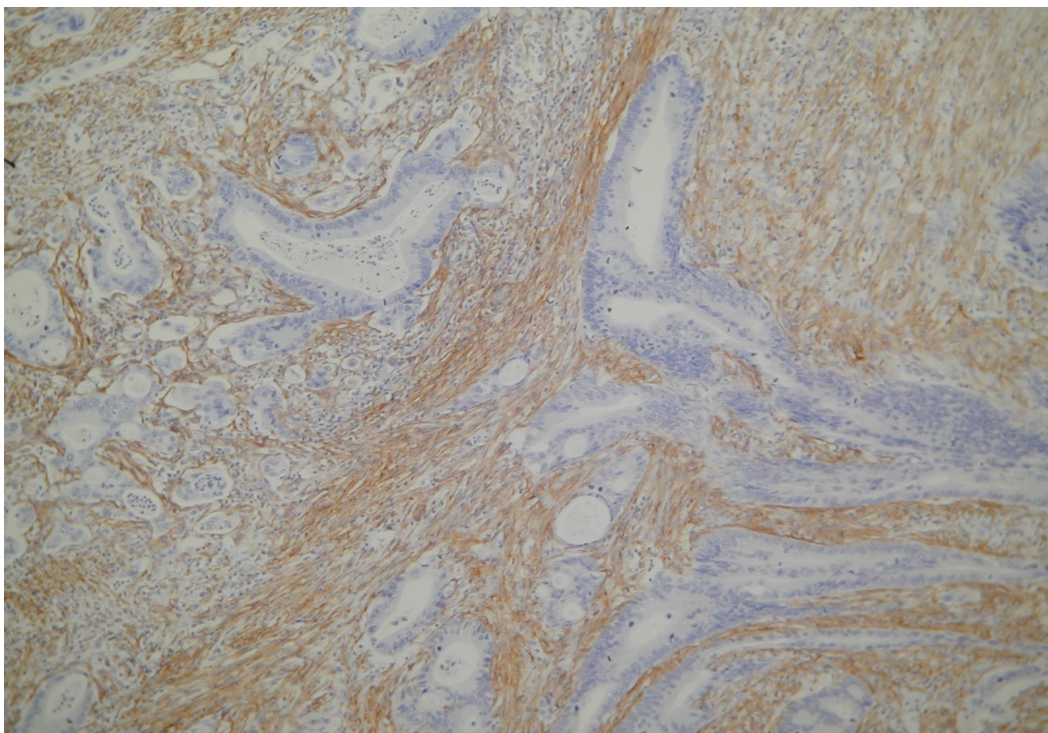
Fot.6. Kolejny przypadek raka trzustki bez ekspresji komórek CD34+ w podścielisku (CD34, x200).



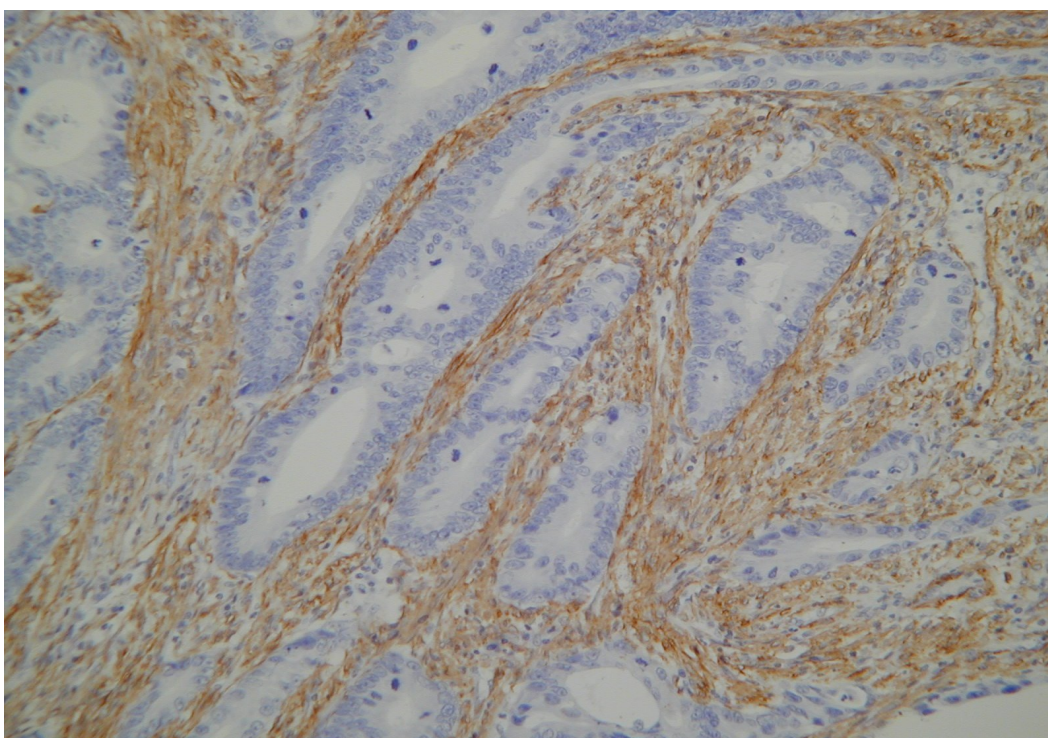
Fot. 7. Wyraźna ekspresja komórek CD34+ w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki (CD34, x100).



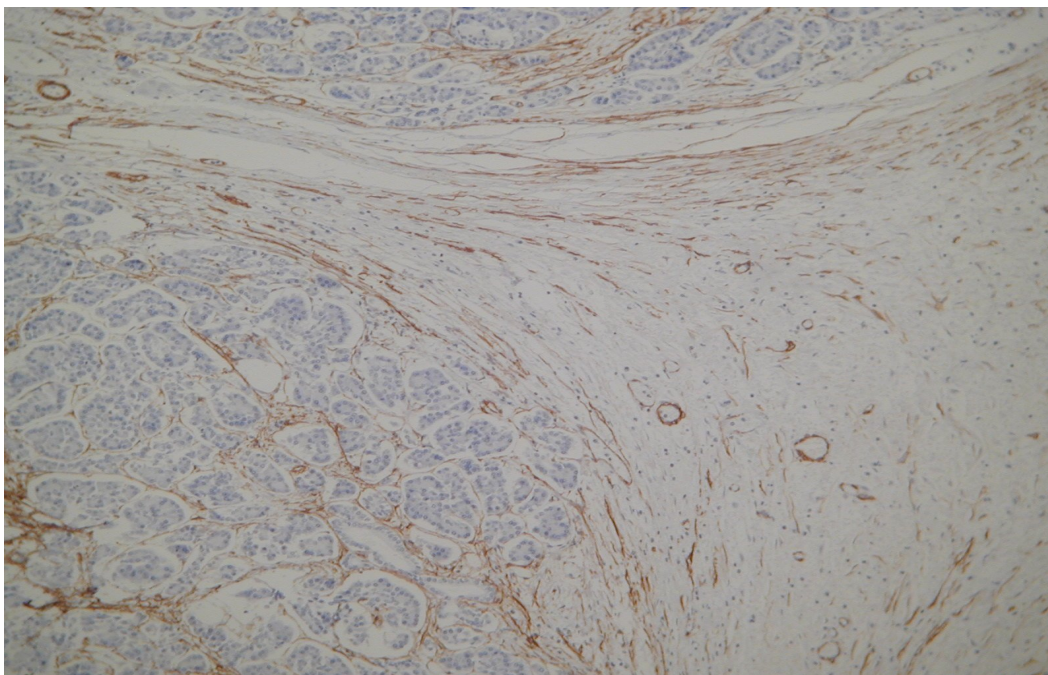
Fot. 8. Pogranicze nacieku raka trzustki i otaczającego mięszu trzustki z wyraźnie zaznaczoną różnicą ekspresji komórek CD34+ w podścielisku (CD34, x40).



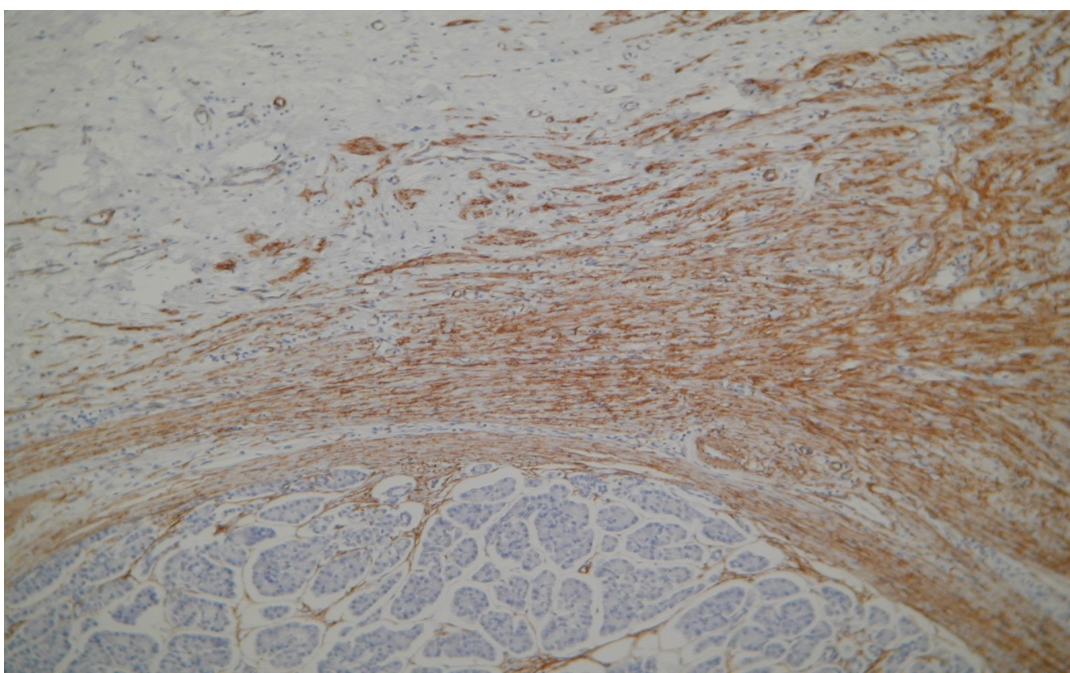
Fot. 9. Wyraźna, rozlana ekspresja komórek ASMA+ w podścielisku raka przewodowego trzustki. (ASMA, x100).



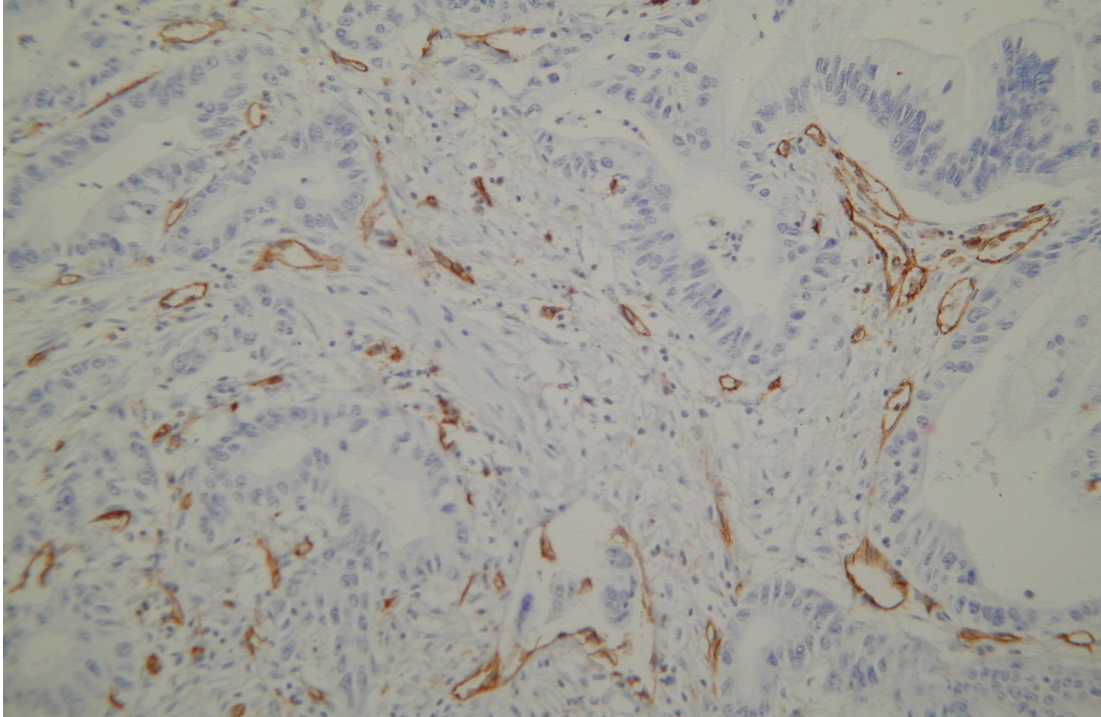
Fot.10. Kolejny przypadek raka trzustki z wyraźną, rozlaną ekspresją komórek ASMA+ w podścielisku (ASMA, x200).



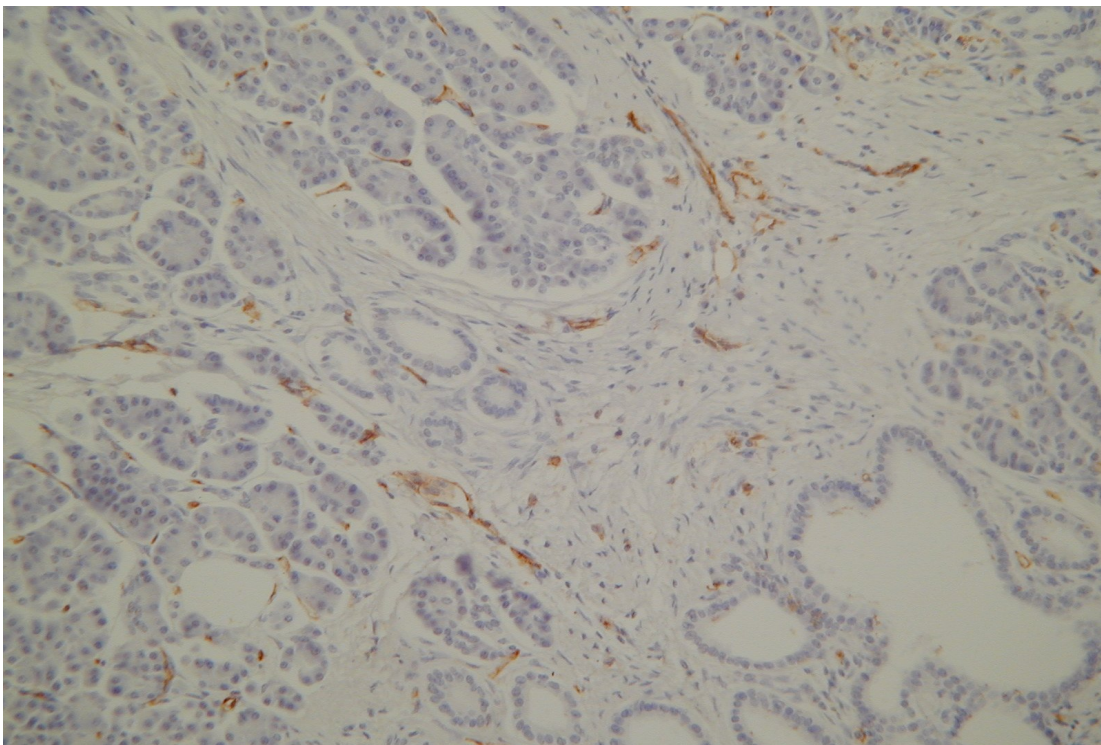
Fot.11. Ekspresja komórek ASMA+ w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki w wielu przypadkach była mniej nasiloną niż w podścielisku raka trzustki z tendencją do „zanikania” w centralnych częściach obszarów nasilonej stromatogenezy (ASMA, x100)



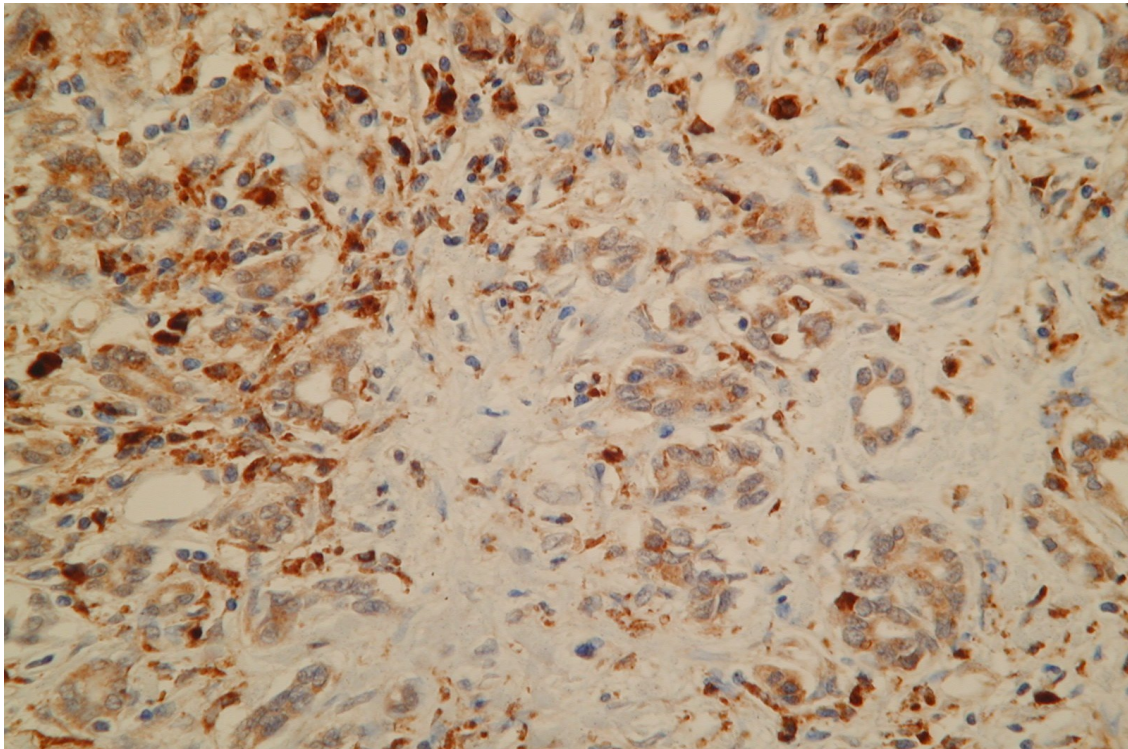
Fot.12. Przypadek przewlekłego zapalenia trzustki z wyraźną ekspresją komórek ASMA+ w podścielisku. Także tutaj widoczna zmniejszona ekspresja w centralnej części obszaru bogatego w podścielisko (górna część fotografii) (ASMA, x100)



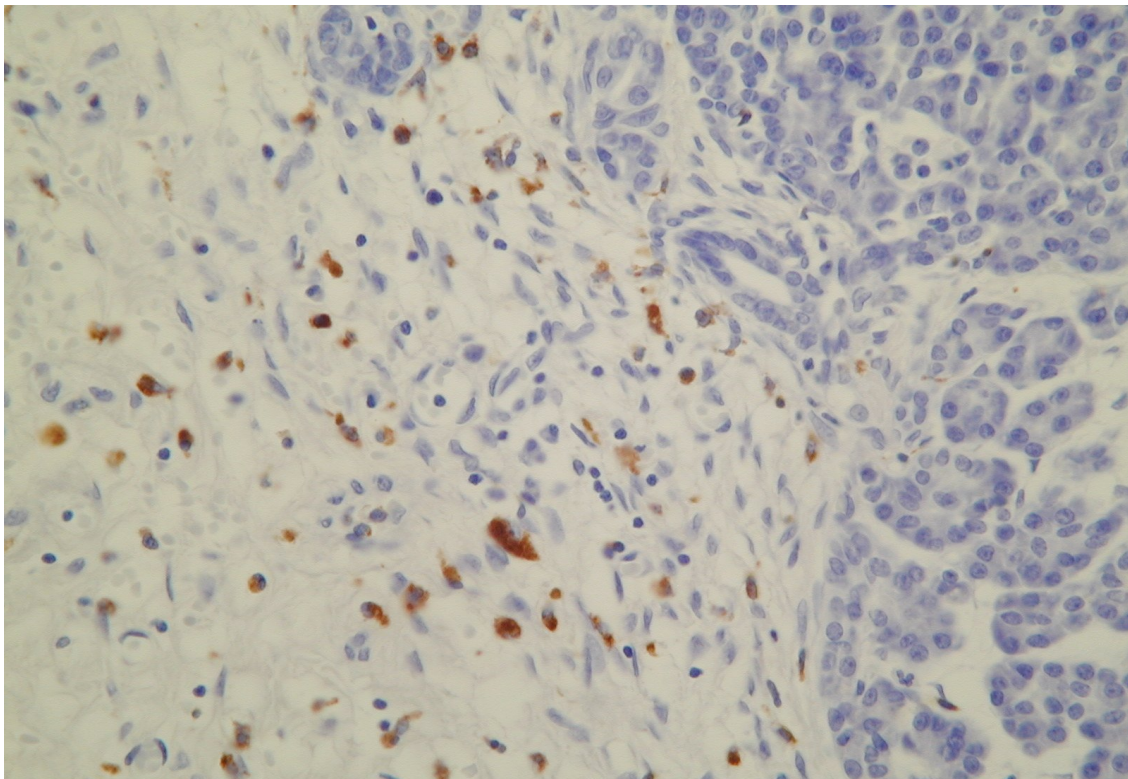
Fot.13. Pole o dużej gęstości naczyniowej – rak przewodowy trzustki (CD31, x200).



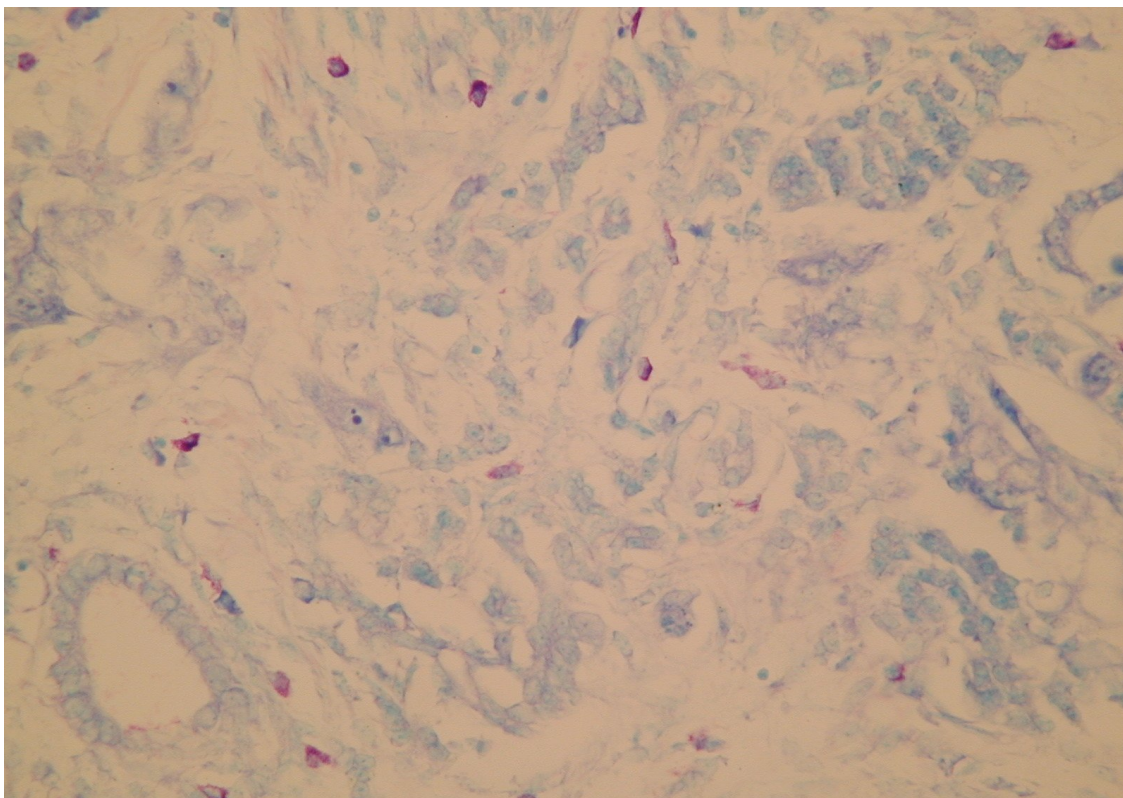
Fot.14. Pole o dużej gęstości naczyniowej – przewlekłe zapalenie trzustki (CD31, x200).



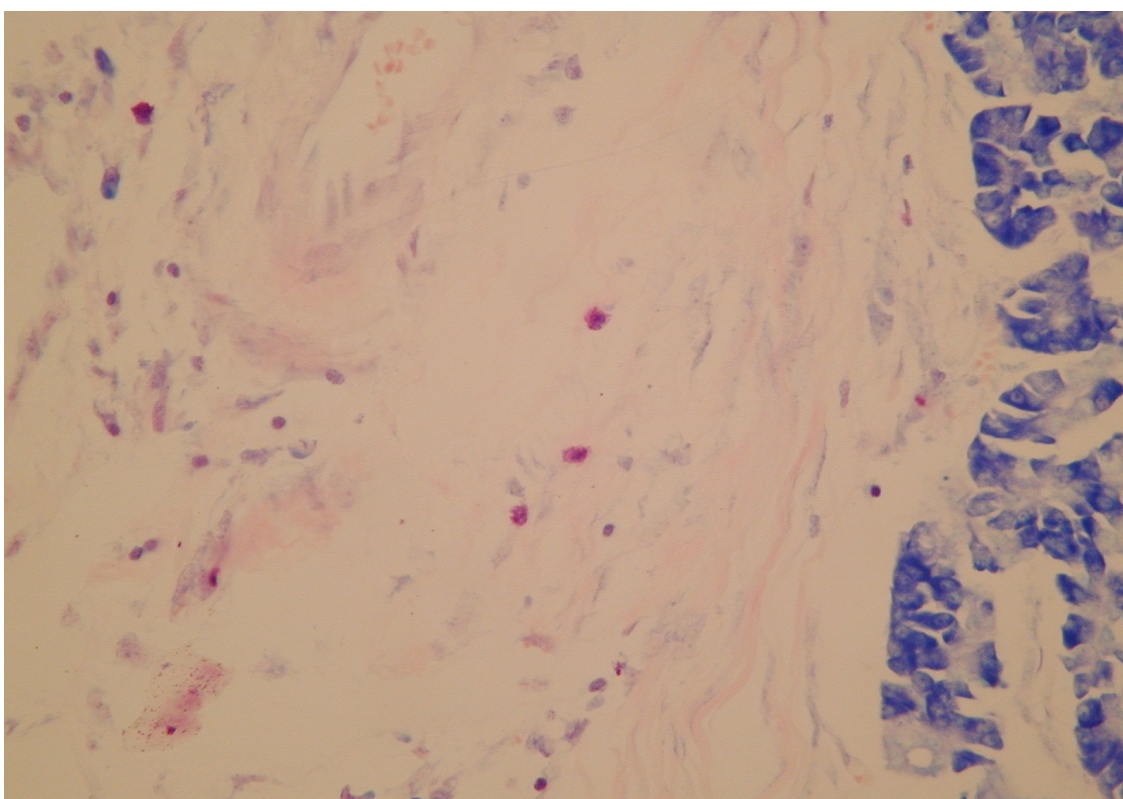
Fot.15. Makrofagi w podścielisku raka trzustki (CD68, x400).



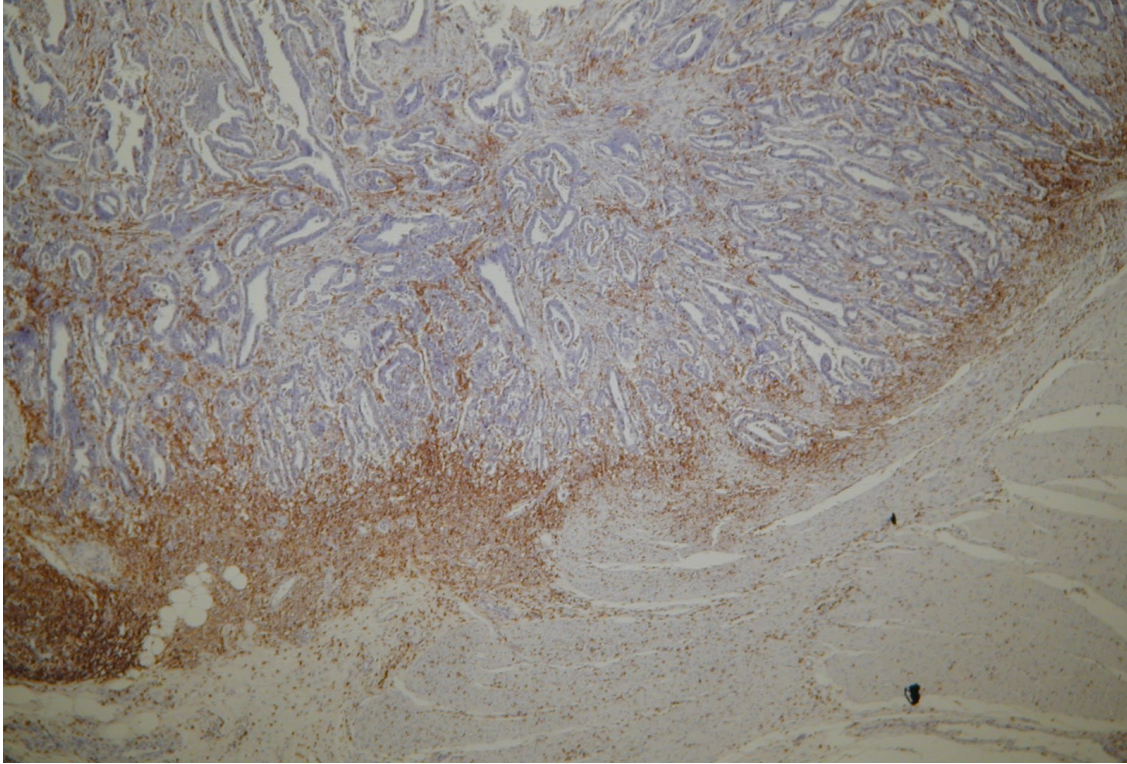
Fot.16. Makrofagi w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki (CD68, x400).



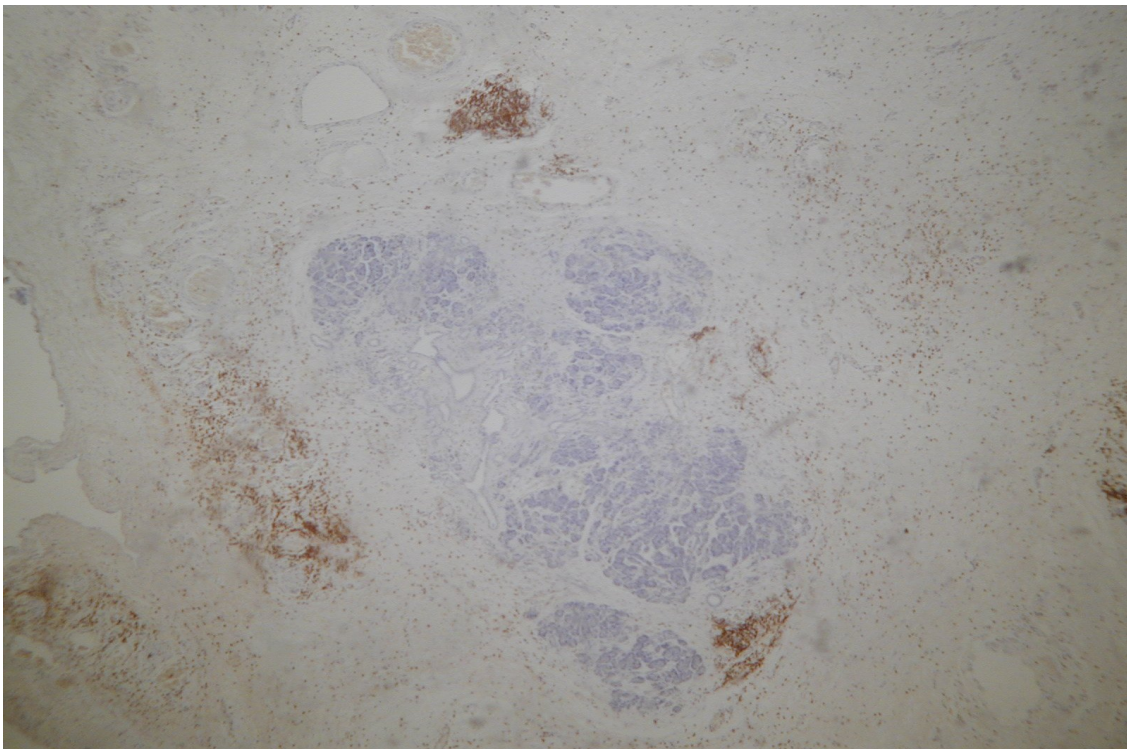
Fot.17. Komórki tuczne w podścielisku raka trzustki (barwienie metodą Giemsy, x400).



Fot.18. Komórki tuczne w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki (barwienie metodą Giemsy, x400).



Fot.19. Front nacieku raka przewodowego trzustki otoczony obfitym naciekiem limfatycznokomórkowym (LCA, x40).



Fot.20. Dystrybucja limfocytów w podścielisku przewlekłego zapalenia trzustki (LCA, x100).