

Received: 23.10.2018
Accepted: 12.06.2019
Published: 14.11.2019

Markery różnicujące dysplazję w przełyku Barretta i raka gruczołowego przełyku

Differentiating dysplasia markers in Barrette sophagus and adenocarcinoma

Adrian Mor¹, Krzysztof Kobus², Urszula Leszczyńska¹, Joanna Reszeć¹

¹ Zakład Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Białystok, Polska

² Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Sokółce, Oddział Chirurgii, Sokółka, Polska

Streszczenie

Jedynym znanym prekursorem gruczolakoraka przełyku (EAC) jest przełyk Barretta (BE). Ta zmiana przednowotworowa może ulegać transformacji do dysplazji małego stopnia i dużego stopnia, z której może się wykształcić EAC. W związku z tym wykrywanie i monitorowanie dysplazji oraz wczesna diagnostyka pod kątem występowania ognisk EAC, są niezwykle ważnymi czynnikami w czasie nadzorowania pacjentów z progresją BE. Badanie histopatologiczne uważa się za złoty standard w ocenie progresji BE. Cechuje je duża użyteczność kliniczna w identyfikacji dysplazji i ocenie ryzyka późniejszego raka u pacjentów z BE. Jednak ten sposób określania stopnia dysplazji pozostaje czynnością subiektywną, w dużym stopniu zależną od wiedzy i doświadczenia osoby przeprowadzającej badanie. W związku z tym istotne wydaje się wprowadzanie do oceny progresji BE czułych i swoistych biomarkerów, które mogłyby zostać wykorzystane jako badania uzupełniające. Wzbogacenie oceny histopatologicznej o ich użycie może usprawnić diagnostykę, monitorowanie i ocenę ryzyka progresji BE oraz rozpoznawanie wczesnych ognisk EAC. Dane literaturowe dotyczące markerów pozwalających na rozróżnienie poszczególnych typów dysplazji i raka towarzyszących BE są dość skąpe. Najistotniejsze z nich zostały zebrane i scharakteryzowane w artykule. Oprócz znanych markerów istnieje dość liczna grupa białek i genów, których ekspresja ulega zauważalnym zmianom podczas rozwoju towarzyszącej BE dysplazji oraz wczesnych faz EAC. Nie przeprowadzono dotąd badań pod kątem ich przydatności przy różnicowaniu typów dysplazji towarzyszącej BE i EAC, jednak dotychczasowa wiedza na ich temat sugeruje, iż niektóre z nich mogłyby znaleźć zastosowanie jako markery pomocnicze w różnicowaniu stadiów dysplazji oraz EAC. W artykule omówiono te o największym potencjale.

Słowa kluczowe:

przełyk Barretta • rak gruczołowy przełyku • dysplazja • progresja • diagnostyka różnicowa

Summary

Barrett's esophagus (BE) is the only known precursor of esophageal adenocarcinoma (EAC). This precancerous lesion can transform into low-grade and high-grade dysplasia, which may develop in the EAC. Therefore, the issues of dysplasia detection and monitoring and early diagnostics for the presence of EAC foci are extremely important factors in the surveillance of patients with BE progression. Histopathological examinations are regarded as the gold standard in the BE progression evaluation. They possess a large clinical utility in the identification of dysplasia and cancer risk stratification in patients with the BE. However, this method is a very subjective, and is heavily dependent on the knowledge and experience of the person conducting it. Therefore, it seems to be important to implement in the BE progres-

	<p>sion diagnostics sensitive and specific biomarkers that could be used as complementary tests. They could improve detection, stratification and monitoring of the progression of BE and the detection of the EAC early stages. Literature data concerning markers distinguishing between different stages of Barrett's-related dysplasia and cancer is very scarce. In this article there we collected and characterized the most important data. Apart from this, there is a fairly large group of proteins and genes. Their expression levels allow for the detection of changes during the development of the BE progression. No studies have been carried out yet for their usefulness in differentiating between types of BE-related dysplasia and EAC, but we know that some of them could be useful as auxiliary markers differentiating between different stages of dysplasia and EAC. The article discusses those with the greatest potential.</p>
Keywords:	Barrett's esophagus • esophageal adenocarcinoma • dysplasia • progression • differential diagnosis
GICID	01.3001.0013.5643
DOI:	10.5604/01.3001.0013.5643
Word count:	11868
Tables:	–
Figures:	2
References:	74

Adres autorki: dr hab. n. med. Joanna Reszeć, Zakład Patomorfologii Lekarskiej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok; e-mail: joannareszec@gmail.com

PRZEŁYK BARRETTA I RAK GRUCZOŁOWY PRZEŁYKU

Rak przełyku należy do najczęściej występujących guzów złośliwych przewodu pokarmowego. Jest bardzo agresywnym nowotworem i cechuje się wysoką śmiertelnością. Częstość zachorowań na jeden z jego typów – raka gruczołowego przełyku (esophageal adenocarcinoma – EAC) w Europie zachodniej i USA wzrasta szybciej niż jakiegokolwiek innego nowotworu. Przełyk Barretta (Barrett's esophagus – BE) jest jedynym jego znanym prekursorem [6, 17, 22, 35, 36, 57].

Przełyk Barretta charakteryzuje się zastąpieniem prawidłowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego w błonie śluzowej dystalnej części przełyku nabłonkiem jednowarstwowym walcowatym, w obrębie którego rozwija się wyspecjalizowana metaplazja jelitowa [33, 46, 72]. Cechą charakterystyczną rozwoju epithelium metaplastycznego jest obecność trzech różnych typów nabłonka jednowarstwowego walcowatego: atroficznego typu żołądkowego zawierający komórki okładzinowe i główne; przejściowego z gruczołami śluzowymi typu wpustowego i wyspecjalizowanego nabłonka typu jelitowego z charakterystycznymi komórkami kubkowymi [5, 22, 33].

Częstość występowania BE wciąż pozostaje niepewna: od 1970 r. liczba stwierdzonych przypadków BE na świecie systematycznie wzrasta, równoległe do wzrostu liczby badań endoskopowych. Średni wiek pacjenta w chwili zdiagnozowania wynosi zwykle około 50–55 lat. Częstość występowania BE wśród populacji ogólnej waha się, według różnych badań, od 0,9 do 5,5% [5, 36]. W najnowszych doniesieniach naukowcy z Włoch i Szwecji

wykazali jego występowanie na poziomie odpowiednio 1,3 i 1,6%. W obydwu przypadkach autorom badań zarzucano jednak, że nastawienie i dobór grup pacjentów mogły doprowadzić do zawyżenia wyników [7, 36]. BE na ogół jest następstwem przewlekłej choroby refluksowej przełyku (Gastroesophageal Reflux Disease – GERD) i jest około 10 razy częstszy u pacjentów cierpiących na objawy refluksu. Średnia roczna stopa konwersji z BE do EAC jest relatywnie niska i według różnych badaczy wynosi 0,12–0,5%. Wzrasta jednak u pacjentów ze stwierdzoną dysplazją dużego stopnia (high-grade dysplasia), u których występuje na poziomie 5,6–6,6% [6, 10, 13, 15, 17, 41].

W ostatnich statystykach z Wielkiej Brytanii, rak przełyku został oceniony jako siódmy, najczęstszy typ raka wśród mężczyzn i czternasty wśród kobiet. Oprócz tego był czwartą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami u mężczyzn i szóstą u kobiet w Europie Zachodniej i USA. Mimo że dane te dotyczą zarówno najbardziej powszechnego histologicznego typu – raka płaskonabłonkowego (squamouscell carcinoma – SCC), jak i mniej popularnego EAC rokowanie obydwu rodzajów nowotworu jest bardzo podobne. Różnicę między zachorowalnością i śmiertelnością wynikają z tego, że ma on bardzo agresywny charakter i stosunkowo późno ujawnia objawy, stąd niski ogólny wskaźnik przeżycia 5-letniego, według różnych doniesień oscylujący na poziomie 10–20% [36, 41, 42, 59]. Istnieje duże zróżnicowanie geograficzne, co do częstości występowania raka przełyku z większą częstością występowania SCC w krajach afrykańskich i azjatyckich. Warto zauważyć, że liczba zachorowań na EAC niepokojąco wzrosła w ciągu ostatnich 4–5 lat w krajach zachodnich, gdzie stał się najczęstszym nowotworem przełyku [59].

W związku z tym, iż BE jest jedynym znanym prekursorem EAC, w celu poprawy wczesnej wykrywalności i zwiększenia przeżywalności, należy położyć nacisk na monitorowanie pacjentów z BE pod kątem progresji choroby i na wczesne diagnozowanie ognisk EAC pojawiających się u pacjentów z towarzyszącą temu schorzeniu dysplazją. Najnowsze dane wskazują, iż z każdym kolejnym stadium nasilenia dysplazji wzrasta ryzyko rozwinęcia się EAC [33, 47, 59]. Stadiem bezpośrednio poprzedzającym wystąpienie nowotworu złośliwego jest HGD, a jej obecność wiąże się z najwyższym, 10-krotnie większym niż średnie, ryzykiem pojawienia się EAC [29, 35, 41, 46, 64]. W związku z tym ważne są badania w poszukiwaniu czułych i swoistych markerów, które pozwolą w przyszłości wcześniej wykrywać obecność dysplazji, skutecznie różnicować jej typy oraz potwierdzić obecność wczesnych ognisk EAC u pacjentów ze zdiagnozowaną HGD.

PATOGENEZA I CZYNNIKI RYZYKA PRZEŁYKU BARRETTA

Rozwój przełyku Barretta jest najprawdopodobniej procesem dwuetapowym. Pierwszy etap obejmuje transformację nabłonka wielowarstwowego płaskiego błony śluzowej przełyku do jednowarstwowego nabłonka walcowatego typu wpustowego (cardiac mucosa), zawierającego komórki gruczołowe [5, 10, 13, 30]. Do zainicjowania procesu dochodzi w odpowiedzi na przewlekłe uszkodzenia błony śluzowej przełyku wywołane przez powtarzające się epizody refluksu żołądkowo-przełykowego, działające drażniąco na jej powierzchnię. Zmiana z nabłonka wielowarstwowego płaskiego na jednowarstwowego walcowatego typu wpustowego zwykle następuje stosunkowo szybko, w ciągu kilku lat. Natomiast drugi etap, rozwój komórek kubkowych i nabranie cech metaplastyki jelitowej przez nabłonek walcowaty, przebiega wolniej, prawdopodobnie w ciągu 5-10 lat. Przełyk Barretta jako stan przednowotworowy może ulegać progresji do małego, a następnie dużego stopnia dysplazji, aż do gruczolakoraka. Cały proces jest powszechnie określany jako sekwencja: metaplastyka-dysplazja-rak Barretta [5, 13, 30, 33, 46].

Środowiskowe czynniki ryzyka

Najistotniejszym czynnikiem ryzyka związanym z rozwojem BE jest GERD. Sugeruje się, że długość odcinka BE jest skorelowana z czasem oddziaływania pH <4, na błonę śluzową przełyku [10, 46, 72]. Badania wykazały również, że czas trwania refluksu, jego częstotliwość i nasilenie objawów również są czynnikami ryzyka rozwoju EAC. Mimo iż występowanie BE jest częstsze u mężczyzn (stosunek 2:1, w odniesieniu do kobiet rasy kaukaskiej), płeć żeńska nie chroni przed rozwojem BE w przypadku występowania zaawansowanych stadiów GERD [10, 13, 26, 42]. Obecność BE nie jest związana jedynie z nadmiernym wydzielaniem kwasu żołądkowego. Porównanie pacjentów z BE do grupy kontrolnej i chorych z GERD i bez BE wskazuje, iż niezwykle istotnym czynnikiem rozwoju choroby jest rodzaj refluksu.

U pacjentów z BE częściej występował refluks żółciowy, co wskazuje, że w rozwoju tego schorzenia uczestniczą kwasy i sole żółciowe [10, 13, 26, 36, 42, 46].

Działanie kwasu i pepsyny osłabia połączenia międzykomórkowe i rozszerza luki między komórkami, umożliwiając w ten sposób składnikom treści refluksowej dostanie się w głąb błony śluzowej przełyku oraz do dalej położonych tkanek. Umożliwia to kontakt substancji drażniących z zakończeniami nerwowymi, wywołując ich pobudzenie [10]. Zmniejszenie pH sprzyja odkładaniu się skoniugowanego kwasu żółciowego, którego oddziaływanie zakłóca wewnątrzkomórkowe mechanizmy i prowadzi do uszkodzenia i obumierania komórek [5, 10, 26]. Mechanizmy sprzyjające większej ekspozycji treści żołądkowej i żółci w przełyku, włączając hipotonię dolnego zwieracza przełyku (zaburzenia bariery antyreflaksowej) oraz przepuklinę rozworu przełykowego (hiatal hernia – HH), są obecne u prawie wszystkich pacjentów z BE. Inne czynniki zaangażowane w rozwój tego schorzenia dotyczą zaburzeń motorycznych przełyku (zaburzenia oczyszczania przełyku), zmniejszenia wrażliwości na ból przełyku, a także spadku wydzielania epidermalnego czynnika wzrostu w ślinie (opóźnione gojenie przełyku) [10, 26].

U pacjentów z długim BE (long Barrett's esophagus – LBE), w porównaniu do pacjentów z krótkim BE (short Barrett's esophagus – SBE) i metaplastyką jelitową wpustu (intestinal metaplasia of the cardia – IMC), częściej występuje HH, a ciśnienie w obrębie dolnego zwieracza przełyku jest bardziej obniżone. W związku z tym narażenie przełyku na działanie składników refluksu jest większe [10]. Towarzysząca stanom zapalnym zwiększona ekspresja cyklooksygenazy-2 (COX-2) w komórkach nabłonkowych stymuluje przyspieszoną proliferację komórek oraz angiogenezę, dlatego obecność GERD, czas trwania oraz nasilenie jego objawów jest czynnikiem prognostycznym rozwoju naczyń w BE, a to odpowiada za potencjał rozwoju złośliwych zmian nowotworowych w trakcie progresji tej choroby [10, 21, 70].

Innym istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia BE i rozwoju EAC jest otyłość. Choć jest związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia objawów GERD, badania epidemiologiczne dowiodły, że występowanie otyłości, również przy braku objawów refluksu, jest czynnikiem ryzyka rozwoju BE [13, 26]. Związane z nią mechanizmy uczestniczące w rozwoju BE pozostają w większości nieznanne. Wiadomo jednak, że tłuszcz trzewny w jamie brzusznej, w przeciwieństwie do podskórnego, jest szczególnie ważnym czynnikiem rozwoju BE. Podejrzewa się, że otyłość może sprzyjać rozwojowi tego schorzenia przez nasilenie zaburzeń w obrębie połączenia żołądkowo-przełykowego (niższe ciśnienie dolnego zwieracza przełyku i przepuklina rozworu przełykowego) oraz indukcję mechanizmów sprzyjających rozwojowi GERD (zwiększone ciśnienie wewnątrzbrzuszne i przejściowa relaksacja dolnego zwieracza przełyku). Dalsze badania wykazały, że towarzyszący otyłości brzusznej wzrost poziomu mediatorów, takich jak leptyna, adiponektyna

oraz innych cytokin prozapalnych wydzielanych przez adipocyty i spadek poziomu cytokin przeciwzapalnych okazuje się bardzo ważnym czynnikiem predysponującym do rozwoju i późniejszej progresji BE bezpośrednio związanym z otyłością. Szczególne znaczenie okazuje się mieć wpływ leptyny, ze względu na jej działanie mitogenne i angiogenne. Cytokina ta jest również związana z rozwojem innych nowotworów żołądkowo-jelitowych oraz raka gruczołu krokowego i raka sutka [10, 13, 26].

Związki azotowe również mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie BE. W ślinie i pokarmach mogą występować różne źródła azotu, takie jak azotany, które są redukowane do azotynów przez bakterie jamy ustnej. Związki te nie wykazują aktywności w neutralnym pH, ale w kwaśnym ujawniają właściwości utleniające. Wiele wskazuje na to, iż mają one właściwości mutagenne. Podczas refluksu oddziałują na komórki dystalnej części przełyku, sprzyjając powstawaniu uszkodzeń ich DNA. Warunki wymagane do syntezy katalizowanych kwasowo związków azotowych obejmują: odczyn pH <4, obecność azotany w nadmiarze kwasu askorbinowego i tiocyjanianów w roli katalizatora. Podczas epizodów refluksu takie warunki pojawiają się w obrębie wpustu przełyku i w mniejszym stopniu w przepuklinie rozworu przełykowego [10, 26, 70].

Wyniki badań nad rolą palenia tytoniu i spożycia alkoholu w patogenezie BE i EAC nie są jednoznaczne, a związek z BE potwierdzają tylko niektóre z nich. Mniejsze ryzyko wystąpienia BE wiąże się ze stosowaniem diety bogatej w owoce i warzywa dzięki wysokim poziomom antyoksydantów przyjmowanych w diecie. Występująca w nich witamina C odgrywa ważną rolę w redukcji związków azotu, dlatego jest wskazywana, jako jeden z domniemych czynników sprzyjających rozwojowi BE [26, 70].

Helicobacter pylori i wirus brodawczaka

Przez wiele lat powszechnie uważano, że *Helicobacter pylori* nie odgrywa istotnej roli w rozwoju BE. Większość badań wskazywała, że bakteria ta nie jest związana z etiologią BE, a nawet, że jej obecność może przeciwdziałać rozwojowi tej choroby [13]. Tezę podpierano tym, iż szczepy *Helicobacter pylori* wykazujące ekspresję cytokin związanych z obecnością genu A (*cagA*) mogą potencjalnie działać ochronnie, zmniejszając wytwarzanie kwasu żołądkowego w wyniku wtórnego zapalenia żołądka. Osoby zainfekowane szczepami tej bakterii mają znacznie obniżone ryzyko występowania aneuploidii w komórkach przełyku i nieznacznie mniejszą częstość występowania EAC [9, 10, 13].

Najnowsze doniesienia, wskazują jednak, że kolonizacja przełyku przez *H. pylori* nasila procesy zapalne w obrębie przełyku, co ułatwia rozwój BE i EAC poprzez nasilenie proliferacji komórek i spowolnienie tempa apoptozy w błonie śluzowej przełyku [1]. Towarzysząca stanom zapalnym związanym z infekcją *H. pylori* nasiloną ekspresją czynnika jądrowego KB (nuclear factor κB – NF-κB), białka aktywują-

cego 1 i COX-2 w komórkach BE odgrywa istotną rolę w rozwoju swoistej odpowiedzi immunologicznej, która sprzyja rozwojowi długotrwałej odpowiedzi zapalnej, przyczyniającej się do powstania nowotworu przełyku [9].

Wirus brodawczaka (human papilloma virus – HPV) jest przedmiotem zainteresowania jako jeden z prawdopodobnych czynników progresji nowotworowej w dystalnej części przełyku. Jego materiał genetyczny był wykrywany w zmianach degeneracyjnych i nowotworach przełyku. Wiadomo, że istnieje ścisły związek HPV z płaskonabłonkowym rakiem przełyku, ale jego rola w rozwoju BE i EAC jest zdecydowanie mniej zrozumiała. Doniesienia są sprzeczne: w większości z nich wykazano, że prawdopodobieństwo jego związku z rozwojem BE jest niewielkie [13, 18]. Najnowsze badania dowodzą jednak istnienia związku infekcji HPV z występowaniem BE [3, 53]. Aktywność transkrypcyjna HPV była bowiem powiązana przede wszystkim z rozwojem dysplazji i dalszej karcynogenezy przełyku, co potwierdza tezę o udziale HPV w kancerogenezie u chorych z BE [3, 53, 54].

Czynniki genetyczne

Podłoże genetyczne predysponujące do rozwoju BE również nie zostało w pełni sprecyzowane. Nie stwierdzono obecności swoistych genów odpowiadających za zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby. Zaobserwowano natomiast częstsze występowanie GERD i BE u krewnych osób chorych oraz u bliźniąt jednojajowych w porównaniu do nieidentycznych bliźniąt. Rejestrowanie bliźniaków sugeruje, że 31–43% przypadków GERD to przypadki dziedziczne. Wyższa niż oczekiwano rodzinna agregacja została potwierdzona zarówno w przypadku BE i EAC. Najnowsze badania sugerują, że odsetek przypadków BE wśród krewnych pierwszego stopnia pacjentów z BE z lub bez objawów GERD wynosił odpowiednio 20 i 18% [10, 13].

Ogólny zarys patogenezy BE

W związku z podanymi wyżej danymi, przy uwzględnieniu czynników ryzyka, rozwój BE wydaje się wymagać uszkodzenia nabłonka błony śluzowej przełyku i patologicznych zaburzeń jego odbudowy [13, 29, 50]. Powody, dla których niektórzy pacjenci z GERD nie mają żadnych zmian patologicznych, inni mają komplikacje w postaci zapalenia przełyku, a u innej grupy pacjentów rozwija BE, nadal pozostają niewyjaśnione. Niektóre doniesienia sugerują, iż to sole i kwasy żółciowe są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję procesów prowadzących do powstania metaplazji jelitowej u pacjentów z GERD [10, 13, 29, 42, 46]. Jankowski i wsp. wykazali, iż przewlekłe oddziaływanie refluksu kwaśnego oraz żółciowego wywołuje rozwój stanu zapalnego błony śluzowej i nadżerek w obrębie nabłonka wielowarstwowego przełyku. Po wytworzeniu się nadżerek, w procesie gojenia, dochodzi do uruchomienia komórek progenitorowych blaszki właściwej błony śluzowej, które proliferując wypełniają miejsca nadżerek [29]. Dalsze długotrwałe oddziaływanie refluksu przyczynia się do

różnicowania komórek progenitorowych w wydzielające śluz komórki nabłonka jednowarstwowego walcowatego, charakterystyczne dla dalszych odcinków błony śluzowej przewodu pokarmowego. Jeżeli w obrębie zmienionego metaplastycznie nabłonka przełyku pojawiają się zaburzenia różnicowania komórek, oznacza to rozwój procesu dysplastycznego [22, 29, 36].

SZLAKI MOLEKULARNE ZWIĄZANE Z ROZWOJEM PRZEŁYKU BARRETTA I JEGO PROGRESJĄ DO GRUCZOLAKORAKA PRZEŁYKU

Udział komórek progenitorowych

Udział komórek progenitorowych uczestniczących w rozwoju nabłonka walcowatego w przełyku oraz inicjowaniu metaplastyki jelitowej nadal nie został wyjaśniony. Najpowszechniej akceptowana hipoteza mówi o udziale procesu różnicowania pluripotencjalnych komórek w podstawnej warstwie nabłonka przełyku. Najnowsze doniesienia wskazują, że także komórki o fenotypie zbliżonym do komórek szpiku kostnego mogą się przyczyniać do regeneracji uszkodzeń przełyku w wyniku wykształcenia nabłonka walcowatego. Wyniki badań uzyskane z mysich modeli wydają się potwierdzać tezę, że BE wywodzi się z komórek progenitorowych umiejscowionych w pobliżu wpustu żołądka w ścisłej bliskości z połączeniem przełykowo-żołądkowym [13]. Zaproponowano dwa modele opisujące pochodzenie BE. U myszy z niedoborem p63 zauważono, że odnowa prawidłowego nabłonka płaskiego przełyku jest zaburzona już na etapie embriogenezy, co prowadzi do migracji szczątkowych embrionalnych komórek walcowatych, znajdujących się na poziomie węzła płasko-kolumnowego (squamous-columnar junction – SCJ), generując nabłonek walcowaty przypominający fenotypem BE. W innym badaniu, Quante i wsp. wykazali, że u myszy z nadekspresją interleukiny-1B (IL-1B) występuje odpowiedź zapalna w rejonie SCJ, która prowadzi do wyłożenia przełyku nabłonkiem walcowatym, podobnym molekularnie do występującego w BE. Zwiększona ekspozycja komórek nabłonka przełyku na żółć i kwas wywołała u myszy długotrwałą reakcję zapalną, która stymulowała rozwój EAC w oparciu o mechanizm Notch-zależny. Ogólnie: oba mysie modele potwierdzają teorię, że BE może się wywodzić z komórek progenitorowych umiejscowionych w SCJ i wyjaśnia, dlaczego BE na ogół pozostaje w anatomicznej ciągłości z nabłonkiem wpustu. Jednak odmienna anatomia mysiego przełyku wskazuje na konieczność dalszych badań w celu porównania tych modeli z patologią człowieka [13, 29, 46, 52].

Teoria transdiferencjacji komórek nabłonka płaskiego przełyku

Alternatywna teoria sugeruje, że BE może się rozwijać w wyniku procesu transdiferencjacji komórek nabłonka płaskiego przełyku lub przez przeprogramowanie komórek macierzystych w kierunku odmiennego fenotypu, włączając w to epigenetyczny proces przeprogramowania komórek

przełyku [7]. Teorię tę wspierają dowody wskazujące, iż w komórkach BE są modulowane geny zaangażowane w różnicowanie i jelitową specyfikację osiową komórek jelitowych. W BE stwierdzono zwiększoną ekspresję genów caudal-related homeo box transcription factor-1, -2 (CDX1 i CDX2), która fizjologicznie występuje w nabłonku okrężnicy. Jest związana z nabyciem fenotypu jelitowego przez komórki przełyku [5, 7, 19]. Ta zmiana ekspresji została niedawno powiązana ze zmianami metylacji promotorów tych genów. Reflaks wywołuje w przełyku stan zapalny i zwiększoną przepuszczalność nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Skutkiem tego, nieróżnicowane komórki występujące w warstwie podstawnej mogą być narażone na drażniące oddziaływanie kwasów i soli żółciowych oraz wpływ mediatorów zapalnych. Wszystkie te czynniki, w procesie aktywacji NF- κ B, podstawowego czynnika transkrypcyjnego w odpowiedzi zapalnej, mogą wywołać nadekspresję CDX2 i IL-8 [13, 52]. Oddziaływanie kwasu deoksycholowego powoduje zahamowanie ścieżki sygnałowej Notch, a skutkiem tego jest wzrost ekspresji białek Hath1 oraz CDX1 i CDX2 [52, 60]. Nasilenie ekspresji białek CDX prawdopodobnie wiąże się z utratą metylacji, która aktywuje promotor CDX2 bądź wytwarzaniem przez tkankę zrębu BMP-4 lub innych czynników morfogenetycznych. Mechanizm ten może być jednym z głównych procesów, które przyczyniają się do powstawania BE, stwierdzono bowiem, że wzrost ekspresji białka CDX1 przyczynia się do zainicjowania najwcześniejszych etapów metaplastyki [62, 71]. Zwiększona ekspresja CDX2 i czynników morfogenetycznych przez komórki podstawne nabłonka przełyku pośredniczy w ich różnicowaniu w komórki walcowate o cechach morfologicznych charakterystycznych dla BE [45, 60, 62].

Deregulacja genów z rodziny homeobox (HOX) i uszkodzenia nici DNA

Nabyta deregulacja genów HOX u osób dorosłych jest związana z procesem nowotworzenia. Niedawno wykazano, że trzy geny *HOXB* (*HOXB5*, *HOXB6* i *HOXB7*) ulegają aktywacji w komórkach BE, poprzez mechanizm epigenetyczny z udziałem potranslacyjnej modyfikacji histonów. Zmiany w ekspresji genów *HOX* w komórkach przełyku są związane z indukcją genów sprzężonych z fenotypem jelitowym. Należałoby ustalić, w których komórkach dochodzi do epigenetycznego przeprogramowania różnicowania genów, zwłaszcza, że niedawno udowodniono brak typowych komórek macierzystych w ludzkim przełyku [13, 60].

Przewlekły reflaks kwasów i soli żółciowych do przełyku zwykle powoduje występowanie w nim ostrych bądź przewlekłych procesów zapalnych. Narażenie komórek przełyku na kontakt z tego typu substancjami drażniącymi może spowodować wytwarzanie reaktywnych form tlenu i tlenków azotu, co wiąże się z oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA i pęknięciami dwuniciowymi. Uczestniczą one w progresji BE z metaplastyki przez dysplazję do EAC. Ponadto oksydacyjne uszkodzenia DNA w BE powodują aktywację telomerazy i niestabilność telomerową, a to może doprowadzić do powstania mutacji sprzyjających kancerogenezie [13, 63].

Znaczenie mediatorów towarzyszących odpowiedzi zapalnej

Stan zapalny wiąże się również z pobudzeniem komórek układu odpornościowego. Naiwne limfocyty T, makrofagi i komórki dendrytyczne towarzyszą rozwojowi zarówno niedysplastycznego jak i dysplastycznego BE oraz EAC. Komórki te mogą sprzyjać nasilaniu dysplazji oraz powstawaniu raka przez wytwarzanie cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostu, które są uwalniane jako część odpowiedzi zapalnej i mogą powodować nasilenie tempa proliferacji i angiogenezę [13, 52].

Postępy biologii molekularnej pozwoliły na wykrycie nieprawidłowej ekspresji różnych genów, które korelują z przechodzeniem od prawidłowego nabłonka przełyku do EAC. Zmiany genetyczne występują na poziomie chromosomalnym lub molekularnym. Rozwojowi i progresji BE towarzyszą: utrata heterozygotyczności w różnych parach alleli, aneuploidia, delecje genów: *APC*, *MCK* i *DCC*, *RBI* oraz zmiany prawidłowej ekspresji genów: nasilona amplifikacja cykliny A i D1 oraz genu *c-erbB2*, mutacje p53 i K-ras, nadekspresja COX-2, Bcl-2, hipermetylacja lub delecja p16 i nieprawidłowa ekspresja kadheryn i katenin oraz racemazy α -metacylokoenzymu A (alpha-methylacyloenzym A racemase – AMACR) [10, 11, 18, 20, 31, 35, 41, 46].

Udział niekodującego RNA w rozwoju metaplazji jelitowej przełyku

Ekspozycja na sole kwasów żółciowych jest związana z deregulacją mikroRNA (miRNA), klasy krótkiego niekodującego RNA uczestniczącego w wielu procesach komórkowych. Warte uwagi są szczególnie miRNA-130a i miRNA-145. MiRNA-130a uczestniczy w regulacji nasilenia ekspresji białka C/EBP- ϵ ; natomiast miRNA-145 jest ściśle związane z aktywacją szlaku BMP4, który wcześniej wiązano z rozwojem BE przez aktywację szlaku Hedgehog [13, 43, 46]. BE i EAC przedstawiają różne profile ekspresji miRNA, których ocena przypuszczalnie mogłaby się nadawać do celów diagnostycznych, ze względu na to, że miRNA są stabilne i wykrywalne w krwi [13, 43].

Inną klasą niekodującego RNA jest długi niekodujący RNA (long non-coding RNA-lncRNA), który pełni różne role w komórce, wliczając w to regulację ekspresji genów oraz kontrolę wzrostu i migracji komórek. Niedawno potwierdzono jego udział w powstawaniu EAC. Wu i wsp. wykazali, że lncRNA AFAP1-AS1 jest hipometylowane i występuje w nadekspresji w BE i EAC, a jego wyciszenie w badaniach *in vitro* hamowało rozwój EAC i stymulowało apoptozę [13].

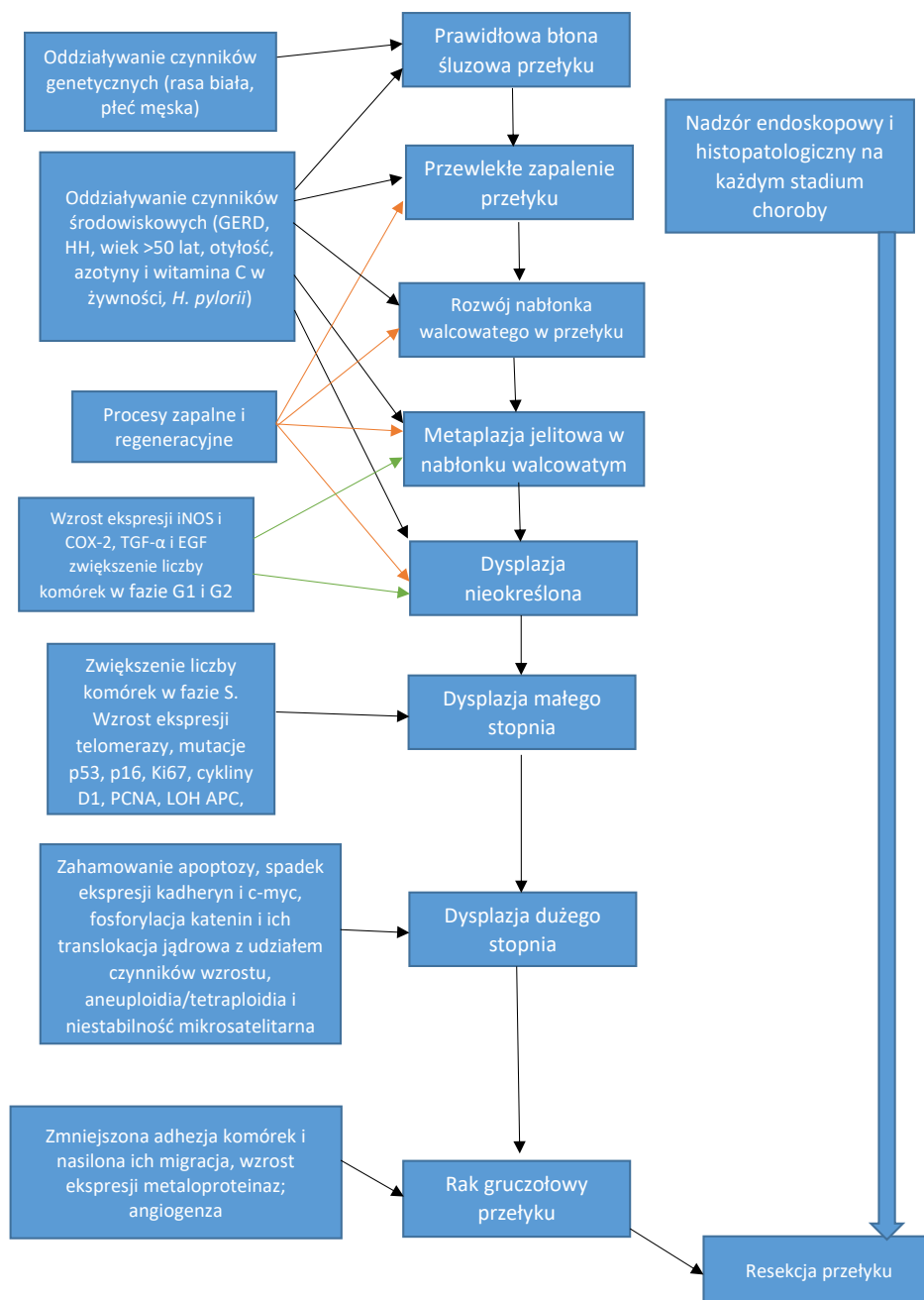
CECHY HISTOLOGICZNE PRZEŁYKU BARRETTA ORAZ TOWARZYSZĄCEJ MU DYSPLAZJI

Badanie histopatologiczne jest uważane za złoty standard w ocenie progresji u chorych z BE. Histologiczna klasyfikacja dysplazji jest bardzo użyteczna klinicznie w diagnostyce i ocenie ryzyka wystąpienia późniejszych stadiów choroby u pacjentów z BE, dlatego ten rodzaj

oceny odgrywa istotną rolę w monitorowaniu pacjentów z tą chorobą. Cechą charakterystyczną metaplazji jelitowej jest występowanie nabłonka jednowarstwowego walcowatego z dobrze uformowanymi baryłkowatymi komórkami kubkowymi. Wyróżniają się dużymi wakuolami cytoplazmatycznymi wypełnionymi barwiącymi się na niebiesko mucynami. BE jako zmiana przednowotworowa może się rozwijać w dysplazję małego stopnia (low-grade dysplasia – LGD), aż do HGD, o większym stopniu nasilenia zaburzeń w różnicowaniu komórek, z niej zaś może się wykształcić EAC [5, 10, 28, 46]. W czasie procesu nowotworzenia, w objętej metaplazją tkance, rozwijają się zmiany morfologiczne związane z niekontrolowanym wzrostem komórek, które pozwalają na rozpoznanie dysplazji w badaniu mikroskopowym [5, 10, 22]. U pacjentów z histologicznie potwierdzoną dysplazją ryzyko progresji do EAC jest znacznie wyższe, w porównaniu do osób jej nieposiadających. Zmiany dysplastyczne podzielono na cztery istotne pod względem klinicznym grupy: brak dysplazji, dysplazja reaktywna (nieokreślona – indefinite for dysplasia – IND), LGD i HGD. Stopień dysplazji określa się przez ocenę cech jąder komórkowych i cytoplazmy, architektury komórek i stopnia ich dojrzałości oraz porównanie tych cech z nasileniem tła zapalnego [22, 28, 30, 33, 37, 46].

Metaplastyczny nabłonek walcowaty może wykazywać różnego stopnia zmiany reaktywne i regeneracyjne, gdyż często towarzyszą mu stan zapalny i uszkodzenia wywołane przez związany z jego obecnością refluks. Dlatego, nawet w przypadku braku dysplazji, biopsje BE mogą zawierać minimalną liczbę komórek atypowych z powiększonymi jądrami, zauważalną hiperchromazją i pleomorfizmem. Zachowana pozostaje jednak prawidłowa architektura tkanki, obfita blaszka właściwa między gruczołami i prawidłowe dojrzewanie komórek w obrębie powierzchni błony śluzowej, które wyróżnia niska wartość stosunku wielkości jąder do cytoplazmy. Jądra mają regularny kształt i są ułożone przypadkowo, a powierzchnia ich otoczek jest gładka. Mitozy, jeśli są obecne, występują wyłącznie w obrębie błony podstawnej nabłonka [5, 25].

W IND nie jest możliwe jednoznaczne określenie, czy zaobserwowane zmiany mają podłoże zapalne, czy nowotworowe. Kategoria ta jest najczęściej używana w razie obecności wyraźnego stanu zapalnego lub utraty nabłonka powierzchniowego. Komórki atypowe cechują się hiperchromatycznymi nakładającymi się na siebie jądrami o nieregularnych granicach. W dnie cew gruczołowych lub po ich bocznych stronach mogą się pojawić struktury przypominające cienkie, podłużne, gęsto rozmieszczone kosmki. W tych obszarach widoczna jest stratyfikacja jąder. Powierzchniowa część nabłonka jest zwykle wolna od atypii. Układ przestrzenny komórek przeważnie nie wykazuje odchyżeń od normy, najwyżej można stwierdzić nieznaczne zagęszczenie cew gruczołowych. Nadal występuje dojrzewanie powierzchniowe [5, 25, 28, 46, 47, 63].



Ryc. 1. Schemat głównych wydarzeń molekularnych w sekwencji metaplaszja-dysplazja-gruczolakorak Barretta [29, 64]

Najważniejszą cechą LGD jest obecność komórek atypowych rozciągająca się w całym przekroju nabłonka, jednak najwięcej zmian można zobaczyć w podstawnej części gruczołów. Charakterystyczne jest ograniczone dojrzwanie powierzchniowe lub całkowity jego brak. Komórki nakładają się na siebie, a ich jądra są powiększone i stłoczone. Mają nieregularne granice i wykazują różnego stopnia hiperchromazję. Można stwierdzić obecność dysplastycznych komórek kubkowych, jednak ich liczba w ogniskach dysplazji jest niewielka. Zniekształcenia architektury

krypt nie są w tym stadium znaczne. Można zauważyć łagodne stłoczenie gruczołów ze zmniejszeniem pośredniej blaszki właściwej. Wzrasta liczba podziałów mitotycznych, jednak nie występują jeszcze nieprawidłowe figury mitotyczne. Polaryzacja komórek pozostaje wciąż zachowana. Naciek zapalny jest zwykle minimalny [5, 25, 28, 37, 46, 71].

W HGD zmiany cytologiczne są znacznie bardziej zaawansowane niż w poprzednim stadium. Jądra komórkowe w obrębie powierzchni epithelium są mocno

powiększone. Stwierdza się silny polimorfizm komórek i pleomorfizm jąder oraz ich nieregularny obrys, a także przynajmniej ogniskową utratę polaryzacji jądrowej komórek. Liczba figur mitotycznych jest podwyższona, pojawiają się one w powierzchniowej części gruczołów. Obecne są nieprawidłowe mitozy. Naciek zapalny powinien być minimalny lub nie występować wcale. Zmiany cytologiczne i architektoniczne są poważne i rozległe. Nie występuje dojrzewanie komórkowe. Obecne są zaburzenia układu przestrzennego komórek o nasileniu łagodnym do ciężkiego. W obrazie widoczne jest stłoczenie cew gruczołowych, a także rozgałęzienie krypt, jednak mniejsze niż w raku. Na powierzchni nabłonka można zauważyć struktury przypominające kosmki [5, 28, 46, 71].

Jeśli stwierdzono obecność dysplazji wysokiego stopnia należy przeprowadzić badanie pod kątem współwystępowania EAC. Może się to okazać bardzo trudne. Cechy histologiczne sugerujące występowanie raka obejmują: ciężkie zmiany architektury komórek, włączając w to komórki blaszki właściwej, desmoplazję, występowanie silnie rozgałęzionej, sitowej lub stałej architektury kanalikowej krypt, rozszerzone kanaliki wypełnione resztkami martwiczymi, rozległe nacieki neutrofilowe w obrębie nabłonka objętego dysplazją, owrzodzenie w obszarze HGD oraz obecność kanalików nowotworowych wkomponowanych w pokrywający przelyk nabłonek płaski [5, 11, 25, 46, 71].

BIOMARKERY ZWIĄZANE Z POWSTAWIANIEM I PROGRESJĄ ZMIAN W BE

Biomarkerem nazywa się możliwy do zmierzenia wskaźnik nasilenia lub obecności jakiegoś stanu chorobowego. Bardziej ogólnie biomarkerem jest wszystko, co może być stosowane jako wskaźnik konkretnego stanu chorobowego lub innego stanu fizjologicznego organizmu [19].

RODZAJE BIOMARKERÓW SPOTYKANE U PACJENTÓW Z BE

Niestabilność genomowa

Podobieństwo wzorów genetycznych BE i EAC poparte badaniami mikromacierzy DNA potwierdziło hipotezę, że BE jest etapem poprzedzającym EAC. Badanie niestabilności genomowej okazało się słabym markerem prognostycznym u pacjentów z BE. Główne oznaki niestabilności w genomie u pacjentów z BE to: zmiany chromosomowe, delecje, mutacje punktowe, zaburzenia metylacji i utrata heterozygotyczności (loss of heterozygosity – LOH) [19, 69].

Nieprawidłowości DNA

Zaburzenia DNA, np. aneuploidia czy tetraploidia są mierzone za pomocą cytometrii przepływowej, mogą być wykorzystywane jako markery predykcyjne u pacjentów z BE bez dysplazji lub z LGD. LOH oznacza utratę prawidłowej funkcji jednego z alleli genu, w którym drugi allel jest już inaktywowany. W długoterminowych badaniach

pacjentów z BE, panel łączący 9p LOH, 17p LOH oraz dodatkowo aneuploidię i tetraploidję był silnym predyktorem rozwoju EAC [19, 46].

Zaburzenia loci w guzie

Ważnym wskaźnikiem ryzyka dysplazji i EAC u pacjentów z BE jest LOH p53. Jak wykazano, jest ona związana z 16-krotnym wzrostem ryzyka rozwoju raka. Jednak w badaniach pacjentów z niedysplastycznym BE, jedynie u 32,4% pacjentów z progresją występowała nadekspresja p53 w początkowym etapie BE. Ponadto u pacjentów z BE z dużym prawdopodobieństwem progresji stwierdzono zmiany ekspresji APC, regulatora szlaku WNT, przez metylację i LOH [19, 74].

Epigenetyka

Procesy epigenetyczne powodują potranskrypcyjne wyciszenie lub aktywację określonych genów bez zmian w sekwencji DNA. W procesy te jest zaangażowanych wiele mechanizmów, w tym metylacja i acetylacja promotorów. Nasiloną metylacją p16 okazała się bardzo rozpowszechniona u pacjentów z BE (34–66%). Wykazano, że hipermetylacja i utrata p16 są niezależnie związane ze zwiększonym ryzykiem progresji metaplazji jelitowej do HGD [31].

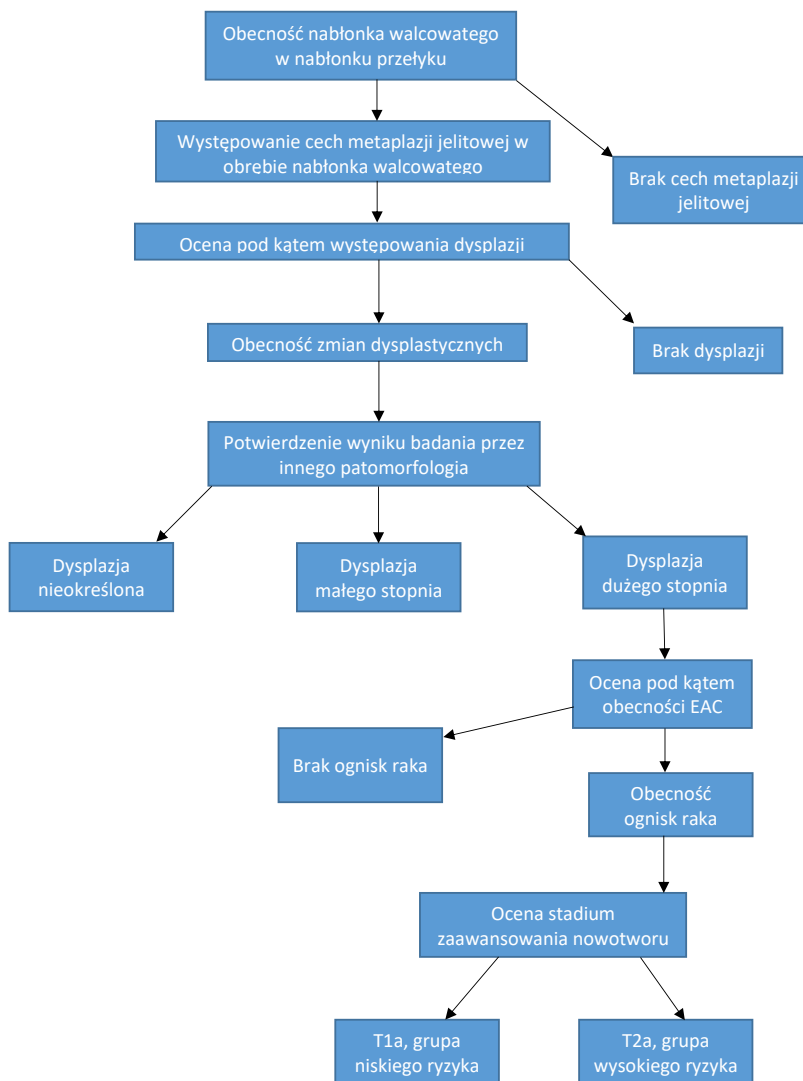
Ponadto badanie poziomu metylacji promotorów w panelu 8 genów (*p16*, *RUNX3*, *HPPI1*, *NELL1*, *TAC1*, *SST*, *AKAP12* i *CDH13*), wykorzystano do przewidywania ryzyka progresji u pacjentów z BE. Do badania włączono 195 pacjentów, a czułość na przewidywanie progresji wynosiła w przybliżeniu 50% [19, 59].

Predyktory cyklu komórkowego

Deregulacja cyklu komórkowego powoduje nagromadzenie aberracji genetycznych w większości komórek nowotworowych. Cykliny są regulatorami cyklu komórkowego i potencjalnie użytecznymi biomarkerami progresji nowotworu. Wykazano, że nadekspresja cykliny A i D1 u pacjentów z BE może być związana z progresją do EAC. Konieczne są dalsze badania w dużych grupach pacjentów, aby potwierdzić wartość predykcyjną cyklin [19, 35, 41, 47, 66, 69].

Zaburzenia proliferacji

Związek wzrostu proliferacji z rozwojem dysplazji w BE potwierdzono w wielu badaniach, podczas gdy niektóre nie wykazały między nimi związku. Badacze wyjaśniają rozbieżności uzyskanych wyników użyciem różnych technik, odmiennych modeli histologicznych nabłonka walcowatego i płaskiego oraz stosowaniem innych wskaźników rozrostowych. Jednym z istotnych markerów proliferacji komórkowej jest Ki-67. W czasie badań długofalowych Ki-67-dodatnie frakcje proliferacyjne nie były jednak związane ze zwiększonym ryzykiem progresji. Konieczne są dalsze badania pomiaru proliferacji z użyciem standaryzowanych technik [19, 27, 59, 67].



Ryc. 2. Schemat szlaków różnicowania w diagnostyce dysplazji i raka towarzyszących BE [10, 36]

Różnorodność klonalna w BE

Niestabilność genetyczna może spowodować występowanie wiele różnych klonów komórkowych obok siebie. Współistnienie kilku różniących się między sobą klonów nazywa się różnorodnością klonalną. U pacjentów z BE, różnorodność klonalna była silnym markerem predykcijnym progresji. Jednak skomplikowana metodologia ogranicza wykorzystanie oceny różnorodności klonalnej, jako markera rokowniczego [19, 27, 67, 69].

DNA mitochondrialne

Mitochondrialne DNA (mtDNA) odgrywa istotną rolę w procesie kancerogenezy. Mutacje mtDNA stwierdzono u 53% chorych bez dysplazji. U pacjentów z BE, delecję genomu mitochondrialnego stwierdzono u 15,4% przypadków niedysplastycznego BE, 40% w LGD, 69,2% w HGD a 90% w tkance okołoguzowej [19].

Biomarkery BE ze względu na znaczenie kliniczne można podzielić na 4 grupy: diagnostyczne, progresji, predykcyjne oraz prognostyczne [64].

- Biomarkery diagnostyczne: TFF3, zmiany chromosomu 7 i 17; mutacje 8q24 (C-MYC), 17q12 (HER2), 20q13 i 17q11.2 (ErbB2 - EAC), analiza proteomiczna surowicy (EAC). Biomarkery diagnostyczne potwierdzają obecność choroby. Analiza histologiczna biopsji pobranej z połączenia przełykowo-żołądkowego pozostaje nadal konwencjonalnym sposobem wykrywania i diagnozowania BE. U pacjentów z bezobjawowym BE ocena ekspresji Trefoil Factor 3 (TTF3) w połączeniu z nieinwazyjną metodą diagnostyczną przyniosła obiecujące wyniki, jako metoda badań przesiewowych. W celu potwierdzenia ich wyników potrzebne są jednak dalsze walidacje i oceny [19, 74].
- Biomarkery progresji: ERCC1, p53, zaburzenia DNA (aneuploidia, tetraploidia), LOH 17p i 9p, EGFR,

HER2, HER3, AMACR cyklina A, cyklina D1, IMP3, β -katenina (CTNNB1), hipermetylacja p16, AMACR, RUNX2, HPP1, badanie panelu 8 genów (p16, RUNX3, HPP1, NELL1, TAC1, SST, AKAP12 i CDH13), CYR61, TAZ, TGR5, p27 i CK7 [4, 11, 12, 17, 19, 20, 28, 32, 33, 34, 41, 50, 59, 65, 66, 69, 74]. Stopień dysplazji stwierdzony w biopsji jest głównym wyznacznikiem postępu BE, chociaż histopatologiczna ocena stopnia dysplazji wiąże się z ryzykiem popełnienia wielu błędów. Do najbardziej obiecujących biomarkerów progresji należą: ocena wzoru ekspresji MCM2, p53, cykliny A i D1, HER2, HER, IMP3, Ki-67, AMACR i TGR5 oraz ocena utraty heterozygotyczności (LOH) na odrębne loci genów, szczególnie na 9p, 16p i 17p. Koszty i czasochłonność badań w dość dużym stopniu ograniczają ich wykorzystanie w praktyce klinicznej [17, 19, 20, 35, 41, 42, 59, 66, 69, 74].

- Biomarkery predykcyjne: utrata alleliczna p16, zaburzenia ploidii DNA (aneuploidia, poliploidia), HSP27, efrina B, polimorfizm genetyczny, P21, P53. Biomarkery z tej grupy są wykorzystywane podczas przewidywania odpowiedzi na terapię. Liczba dostępnych biomarkerów predykcyjnych jest ograniczona i kategoria ta wymaga dalszej badań w poszukiwaniu nowych markerów [19, 69, 74].
- Biomarkery prognostyczne: katepsyna D, AMACR poziom AKR1D10, AKR1C2 mRNA, DCK, PAPSS2, SIRT, TRIM44, utrata p16, wzrost C-MYC, ekspresja ASS, profil ekspresji miRNA, cyklina A, cyklina D1, EGFR, TGF- α , HER2, TGF- β 1, APC, HER3, IMP3, p16, CYR 61, TAZ, TGR5, p53, COX-2, telomerazy, VEGF, TIMP [1, 7, 12, 17, 19, 20, 32, 33, 35, 43, 49, 59, 61, 65, 66, 69]. Biomarkery te wskazują, jakie jest rokowanie EAC i szacowany czas przeżycia. Do tej kategorii należy większość biomarkerów. Należą do niej czynniki sygnałowe wzrostu i niewrażliwości na sygnały hamujące wzrost, markery unikania apoptozy, nieograniczonego potencjału replikacji (telomerazy), markery pobudzenia angiogenezy, inwazji i przerzutów oraz marker zróżnicowania guza i stanu zapalnego związanego z rakiem [19, 59, 69].

MARKERY RÓZNICUJĄCE ZMIANY ZWIĄZANE Z PROCESAMI ZAPALNYMI I REGENERACYJNYMI OD DYSPLAZJI W PRZEŁYKU BARRETTA ORAZ DYSPLAZJĘ DUŻEGO STOPNIA OD RAKA GRUCZOŁOWEGO PRZEŁYKU

Markery o udowodnionym znaczeniu diagnostycznym

Najnowsze ustalenia wskazują, iż każde następne stadium rozwoju dysplazji towarzyszącej BE wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia EAC [47, 48]. Poszczególne zmiany w trakcie rozwoju dysplazji w BE są niewielkie, zachodzą płynnie, w różnym tempie i obejmują szeroki zakres wzorów morfologicznych atypii związanych z procesami regeneracji i naprawy komórek. Ze względu na to histopatologicznej diagnostyce dysplazji towarzyszy znaczny stopień zmienności międzyobserwacyjnej, dotyczy to zwłaszcza przypadków w dolnym

krańcu zakresu progresji, czyli oddzielenie zmian regeneracyjnych od wczesnej dysplazji, nawet wśród doświadczonych specjalistów w dziedzinie patomorfologii przewodu pokarmowego [28, 63]. Ostateczna ocena stopnia dysplazji we fragmentach tkankowych często bywa również utrudniona ze względu na styczny sposób pobierania próbki, obecność artefaktów lub brak epithelium powierzchniowego w obrębie biopsji. Najwyższy poziom zmienności w obrazie histologicznym i trudności w klasycznej ocenie histopatologicznej występują przy różnicowaniu występujących w IND zmian regeneracyjnych i zapalnych z LGD oraz HGD. Towarzyszące jej zmiany w nabłonku, zwłaszcza w warunkach obecności aktywnego stopień atypii komórkowej i strukturalnej, której obraz mikroskopowy niejednokrotnie bardziej przypomina HGD niż LGD [4, 35, 37, 48].

Proces różnicowania między HGD i LGD opiera się przede wszystkim na podstawie histopatologicznej oceny stopnia aberracji architektonicznych i cytologicznych. Jednak ten sposób określania stopnia dysplazji nadal pozostaje czynnością subiektywną, w dużym stopniu zależną od wiedzy i doświadczenia osoby przeprowadzającej badanie. W związku z tym, iż w przebiegu procesu progresji BE z dysplazji do EAC, zmiany zachodzą w sposób ciągły i w niejednakowym tempie, nie ma ściśle określonych punktów odcięcia, które pomagają precyzyjnie rozdzielić te dwa etapy dysplazji. Na ogół całkowity stopień dysplazji jest określony przez cechy najbardziej nietypowej części nabłonka. Jednak – jak dotąd – nie zbadano, jaka dokładnie liczba dysplastycznych krypt wykazujących duży stopień zmian jest konieczna, aby jednoznacznie stwierdzić w badanej próbce przejście z LGD do HGD. Dlatego nadal jest to wartość zmienna, różna u poszczególnych ekspertów. Także różnicowanie między wczesnymi ogniskami gruczolakoraka a stopniem dysplazji bezpośrednio poprzedzającym ich wystąpienie – HGD często jest ważne klinicznie i ma istotny wpływ na rokowanie, lecz w tradycyjnym badaniu histopatologicznym pozostaje czynnością bardzo trudną [4, 35, 47].

Postawienie precyzyjnego rozpoznania podczas oceny stopnia zaawansowania BE, w oparciu wyłącznie o tradycyjne metody histopatologiczne, w niektórych przypadkach może być problematyczne, nawet dla doświadczonego specjalisty. Dlatego niezwykle ważne wydaje się wykorzystanie białkowych i molekularnych markerów tkankowych pozwalających na różnicowanie między poszczególnymi typami dysplazji oraz dysplazją i rakiem we wszystkich wątpliwych przypadkach [47, 68]. Szczegółowy system oceny histologicznej w oparciu o zwalidowane markery tkankowe lub molekularne może zapewnić jednolitość interpretacji histologicznej dysplazji towarzyszącej BE oraz usprawnić ocenę ryzyka prawdopodobieństwa rozwinięcia się EAC [35].

Dane literaturowe dotyczące markerów białkowych i genetycznych przydatnych jako badania pomocnicze przy ocenie i diagnostyce różnicowej poszczegól-

nych typów dysplazji związanej z BE oraz dysplazji i EAC, w materiałach pochodzących z biopsji błony śluzowej przełyku, u pacjentów z progresującą metaplazją Barretta, pozostają dość skąpe [48]. Przyczyną stosunkowo niewielkiej liczby doniesień o ich potwierdzonej użyteczności w tego typu badaniach jest to, iż niewiele spośród tkankowych biomarkerów białkowych i genetycznych zostało dotychczas zbadanych pod tym kątem. Najistotniejsze z nich zostaną omówione niżej.

Barwienie immunohistochemiczne dla antyfosforylowanego histonu H3 (pH3) jest wiarygodnym markerem pozwalającym na wykrycie figur mitotycznych i nasilenia podziałów komórkowych. Fosforylacja histonu H3 powoduje bowiem kondensację chromatyny i uruchamia proces mitozy. Rezultaty dotychczasowych badań prowadzonych pod kątem oceny przydatności immunohistochemicznego barwienia pH3 w różnych stadiach progresji BE doprowadziły do wniosku, że fosforylowane histony H3 mają duży potencjał, jako marker wspomagający badanie histopatologiczne. Badacze wskazują na użyteczność oceny ekspresji pH3, jako histopatologicznego markera pomocniczego, pozwalającego na różnicowanie poszczególnych typów dysplazji oraz EAC. Dowiedziono, iż w oparciu o jego ocenę można skutecznie różnicować IND od LGD i HGD oraz LGD od HGD, a także HGD i EAC w biopsjach błony śluzowej przełyku od pacjentów z progresją BE [23].

Komórki nowotworowe wykazują zwiększony wychwyty glukozy. W procesie tym uczestniczy ludzki czerwono-krwinkowy transporter glukozy 1 (human erythrocyte glucose transporter – Glut-1). Należy do rozrastającej się rodziny białek transbłonowych transporterów glukozy. Jego ekspresja i aktywność jest regulowana przez onkogeny i czynniki wzrostu. Wykazano, że zwiększony poziom Glut-1 występuje w EAC towarzyszącym BE. Badania prowadzone nad chronologią ekspresji Glut-1 w trakcie poszczególnych stadiów progresji BE w wycinkach tkankowych z metaplazją jelitową, wywodzącą się z niej dysplazją oraz EAC jednoznacznie wykazały, że jego ekspresja pojawia się wyłącznie w raku. To, iż jego ekspresja pojawia się pod koniec procesu kancerogenezy Barretta doprowadziło badaczy do wniosku, iż Glut-1 może być markerem pozwalającym na różnicowanie HGD od w pełni rozwiniętego EAC [73].

Zmiany w charakterystyce histochemicznej mucyn powierzchniowych nabłonka są znakiem rozpoznawczym metaplazji jelitowej oraz jej rozwoju w kierunku EAC [8, 50]. Badania nad zmianami ekspresji produktów genów mucyny 1 i 2 (MUC1 i MUC2) w BE, wywodzącej się z niego dysplazji i EAC wykazały nieprawidłową ekspresję MUC2 (mucyny jelitowej) w niedysplastycznej metaplazji oraz jej zanik, gdy komórki przekształcają się dysplastycznie, jak również brak ekspresji MUC1 w nabłonku dysplastycznym przy jej obecności ekspresji w EAC [8]. Obecna wiedza na temat zmian poziomu ekspresji mucyn dowodzi, że MUC1 może być wykorzystana jako marker, pozwalający wykryć obecność ognisk EAC

na tle tkanek zmienionych dysplastycznie w biopsjach śluzówki przełyku [8, 50].

Ki-67 jest antygenem jądrowym obecnym w komórkach proliferujących (faza G1, S, G2 i M), który nie występuje w komórkach znajdujących się w spoczynku (fazy G0). Wzór ekspresji jądrowej tego białka zależy od nasilenia proliferacji komórkowej i dzięki temu odpowiada histologicznej progresji BE, co pozwala na różnicowanie typów dysplazji [2, 27, 41]. Stwierdzono obecność znaczących różnic w nasileniu jego ekspresji między pacjentami z niedysplastyczną metaplazją, kolejnymi etapami postępującej dysplazji i EAC. Zaobserwowano zwiększenie jego ekspresji oraz zakresu jego występowania w zmienionej chorobowo tkance w progresji BE, zależne od stopnia zaawansowania schorzenia [27, 41, 67]. W HGD ekspresję Ki-67 stwierdza się głównie w nabłonku i górnej powierzchni krypt stref, a w LGD obserwuje się ją przede wszystkim w dolnej strefie krypt. Dzięki temu ocena odsetka jąder wykazujących ekspresję tego białka w każdej ze stref krypt o budowie jelitowej formowanych przez nabłonek walcowaty w metaplastycznie zmienionej śluzówce pozwala na różnicowanie HGD od LGD [27, 67].

Badania panelu komórkowych immunohistochemicznych markerów nowotworowych towarzyszących zwiększonej proliferacji pod kątem ich wykorzystania w monitorowaniu procesu progresji z BE do EAC wykazały, że rozwojowi EAC towarzyszą liczne zmiany w ekspresji biomarkerów, w tym: wzrost akumulacji białka p53 [2, 34, 41, 65, 72], spadek jądrowej i wzrost błonowej ekspresji CTNNB1 oraz wzrost ekspresji cyklin A i D1 [35, 41, 65, 66]. Zaobserwowano istotne różnice w ekspresji wymienionych białek między LGD i HGD. Badania stężenia białka p53 w próbkach pobranych z błony śluzowej przełyku okazały się pomocne w ocenie złośliwego potencjału dysplazji nabłonka przełyku u pacjentów z niedysplastyczną metaplazją jelitową i IND [15, 28, 34, 65]. W przypadku białek z rodziny HER obserwuje się zwiększenie ich ekspresji w zmianach dysplastycznych połączenia żołądkowo-przełykowego [17]. Zaobserwowano znaczącą różnicę w poziomie nasilenia ekspresji receptora kinazy tyrozynowej HER2/neu (ERBB-2) między HGD i EAC oraz HER3 między LGD i HGD [17, 65]. Wymienione białka mogą być wykorzystywane pomocniczo do oceny stopnia zaawansowania zmian dysplastycznych w BE oraz różnicowania między dysplazją a EAC [17, 34, 65]. W ostatnim czasie dowiedziono, iż mają one również duży potencjał jako markery przydatne w predykcji ryzyka nasilenia procesu nowotworowego u pacjentów z BE na różnym stadium progresji choroby [2, 11, 15, 17, 28, 35, 72].

Białko wiążące mRNA 3 insulinopodobnego czynnika wzrostu II (insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 3 – IMP3) to nowy biomarker w diagnostyce dysplazji i raka w towarzyszących BE. Został zidentyfikowany jako białko onkozarodkowe, silnie modulujące procesy proliferacji komórkowej, adhe-

zji i przerzutowania nowotworów złośliwych. Najnowsze doniesienia potwierdzają, iż pozwala ona na wykrywanie i różnicowanie poszczególnych etapów dysplazji występujących w progresji BE. Wykazano, iż różnice w poziomie jego ekspresji pozwalają na diagnostykę różnicową między IND i LGD, LGD i HGD oraz IND i HGD w obrębie metaplastyki jelitowej przełyku. Część ta okazała się również przydatna do oceny ryzyka nasilenia progresji BE [20].

AMACR jest enzymem, obecnym w mitochondriach i peroksydach, biorącym udział w β -oksydacji kwasów tłuszczowych o rozgałęzionych łańcuchach. Ulega nadekspresji w wielu nowotworach. Prowadzone dotychczas badania wykazały, iż jest bardzo swoistym markerem zmian nowotworowych w obrębie BE, zwłaszcza obecności dysplazji [14, 40, 41, 56]. Jego ekspresja jest bardzo typowa dla występowania zmian dysplastycznych w obrębie BE oraz stopniowo wzrasta wraz z ich nasileniem [14, 41, 56]. Według różnych badaczy, ocena ekspresji tego białka może być bardzo przydatna w diagnostyce pod kątem obecności LGD [56] oraz do wykrywania HGD [40] w zmienionej metaplastycznie tkance. AMACR charakteryzuje się również dużą swoistością przy różnicowaniu między HGD i IND [14, 40] oraz IND od LGD, gdy klasyczna ocena histopatologiczna jest niewystarczająca do postawienia jednoznacznego rozpoznania [56]. Wykazano, iż silna ekspresja AMACR wiąże się ze zwiększonym ryzykiem progresji nowotworu u pacjentów z niedysplastyczną metaplastją, choć według najnowszych doniesień jej skuteczność, jako markera diagnostycznego dysplazji, jak i predyktora postępu procesu nowotworowego w BE jest niższa niż w przypadku oceny poziomu ekspresji p53, Ki-67, czy IMP3 [2, 11, 20, 33, 41].

Panel czterech białkowych biomarkerów immunohistochemicznych: CDX2, p120ctn, c-Myc i Jagged1 może być użyteczny, jako badanie wspomagające klasyfikację histopatologiczną dysplazji. Ekspresja każdego z nich zauważalnie zmienia się w przebiegu progresji BE. Największe różnice w jej poziomie występują między LGD i HGD. Z pomocą tego panelu można rozróżnić LGD i HGD z dużą czułością i swoistością. Może być przydatny w diagnostyce trudnych przypadków i może ułatwić postawienie diagnozy, gdy nie można postawić precyzyjnej diagnozy w oparciu jedynie o klasyczne badanie histopatologiczne [32].

Sprzężony z białkiem G receptor powierzchniowy TGR5 indukuje odpowiedź na oddziaływanie kwasów żółciowych na komórkę, m.in. przez aktywację kinazy MAPK oraz nasilenie wytwarzania cAMP. Poziom ekspresji tego receptora u pacjentów z HGD i EAC towarzyszących BE był znacznie wyższy w niedysplastycznej metaplastji lub LGD. Dowodzi to, iż TGR5 może być potencjalnym markerem progresji od BE do EAC. Okazał się także przydatny w diagnostyce różnicowej LGD i HGD, w sytuacjach, gdy ocena tradycyjna histopatologiczna nie przynosi jednoznacznego rozwiązania [42].

Badania nad zmianami w genomie towarzyszącymi procesom transformacji nowotworowej BE zwiększają wiedzę na jej temat. Ponadto dowodzą, że wiele spośród towarzyszących procesowi nowotworzenia aberracji może się okazać użytecznymi biomarkerami pozwalającymi na rozróżnienia poszczególnych stadiów progresji nowotworowej. Wyniki badań wskazują, iż utrata 7q33-q35 ma duży potencjał by stać się nowym biomarkerem, pozwalającym różnicować LGD i HGD, natomiast utrata 16q21-q22 oraz nasilenie amplifikacji 20q11.2-q23.1 pozwalają na potwierdzenie obecności ognisk raka u osób z HGD [55].

Markery o domniemanym znaczeniu diagnostycznym

Żaden z markerów tkankowych nie został dotychczas zwalidowany, jako w pełni korelujący z histologiczną progresją metaplastyki Barretta [19]. Oprócz wymienionych wyżej markerów, wobec których prowadzono badania pod kątem ich przydatności w diagnostyce różnicowej poszczególnych etapów dysplazji oraz raka towarzyszących BE, istnieje również liczna grupa białek i genów, których poziom ekspresji ulega zauważalnym zmianom podczas rozwoju dysplazji Barretta oraz wczesnych stadiów EAC [19, 29, 64]. Wiele spośród nich stanowi już potencjalne bądź rutynowo wykorzystywane biomarkery pomocnicze, wspomagające diagnozowanie zmian dysplastycznych towarzyszących postępowi metaplastyki jelitowej lub wykrywanie obecności ognisk raka Barretta w biopsji. Jak dotąd nie oceniano ich jednak pod kątem użyteczności do różnicowania poszczególnych typów dysplazji oraz raka Barretta na tle HGD. Wiadomo jednak, iż niektóre z nich mogą się okazać pomocne. Biomarkery, co do których uda się potwierdzić zależność ich profilu ekspresji z rozwojem histologicznych stopni dysplazji, są lub w toku dalszych badań mogą się okazać również wartościowymi narzędziami w przewidywaniu ryzyka prawdopodobieństwa rozwinięcia się EAC. Najbardziej obiecujące zostały scharakteryzowane niżej.

Należący do omówionej wcześniej panelu markerów tkankowych CDX2 jest białkiem bardzo swoistym dla komórek nabłonka jelitowego, podobnie jak CDX1 i kadheryna wątrobowo-jelitowa (liver-intestinal cadherin - LI-kadheryna), które podobnie jak CDX2 zostały uznane za potencjalne markery o wysokiej czułości, pozwalające na wczesne diagnozowanie BE i monitorowanie późniejszych zmian w jego przebiegu. Wiadomo, że nasilenie ekspresji LI-kadheryny wzrasta stopniowo w trakcie rozwoju zmian dysplastycznych towarzyszących BE, w porównaniu do prawidłowego nabłonka płaskiego, by osiągnąć największy poziom w HGD. Jej ekspresja jądrowa w EAC zauważalnie spada w porównaniu do jej poziomu w HGD, a zdarza się nawet, że jej poziom bywa wręcz nieoznaczalny [68]. Natomiast poziom ekspresji CDX 1 zmniejsza się w czasie progresji choroby. Spadek ten koreluje z rozwojem towarzyszącej jej dysplazji. Najbardziej znanym mechanizmem odpo-

wiedzialnym za ten spadek wiąże się z hipermetylacją promotora tego białka [61]. Zmiany ekspresji tych markerów towarzyszące rozwojowi BE zdają się mieć duży potencjał w różnicowaniu EAC od HGD u osób z BE.

Cytometryczna analiza DNA jest uważana za bardziej czułą metodę oceny nasilenia zmian przedrakowych u pacjentów z postępującym BE w porównaniu z badaniem histopatologicznym. Cechuje ją mniejsze ryzyko wystąpienia wyniku fałszywie dodatniego, pozwala również na wykonywanie badań retrospektywnych. Korelacja między rosnącym stopniem dysplazji i aneuploidii DNA jest bardzo znacząca [44].

Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor – FGF-1), należy do rodziny polipeptydów, biorących udział w różnicowaniu i proliferacji komórkowej. W tkankach EAC zaobserwowano znacznie podwyższoną ekspresję mRNA i białka tego czynnika. Poziom jego ekspresji w zmianach prekursorowych wtórujących temu nowotworowi (BE, LGD, HGD) sugeruje, że może się okazać istotnym markerem pozwalającym na różnicowanie LGD od HGD. Badania wskazują, że u pacjentów z gruczolakorakiem, który powstaje w wyniku progresji BE, FGF1, na ogół ulega stopniowej akumulacji w czasie progresji metaplastji do nowotworu. HGD towarzyszy słaba do średnio umiarkowanej ekspresja tego białka. W przeciwieństwie do HGD w LGD występuje ona bardzo rzadko, jedynie na bardzo słabym poziomie [58].

MicroRNA (miRNA) są małymi (o długości 16-29 nukleotydów), cząsteczkami RNA, które wchodzi w skład niekodującej ewolucyjnie zachowanej klasy endogennych ryboregulatorów, które wpływają na ekspresję genów przez degradację docelowego mRNA lub redukcję jego translacji przez wiązanie się z jego nieulegającym translacji regionem 3'. W przypadku występowania nowotworów i ich przerzutów, rosnąca liczba miRNA uczestniczy w deregulacji ekspresji genu, co czyni je ważną nową klasą onkogenów oraz supresorów wzrostu nowotworów. Stosunkowo niedawno miRNA zostało zidentyfikowane, jako dodatkowy poziom potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Wpłynęło to na ocenę ich wartości jako nowotworowych markerów diagnostycznych i prognostycznych. Do tej pory, w przypadku każdego analizowanego nowotworu jego profil miRNA znacząco różnił się od odpowiadającej mu tkanki zdrowej. Badania nad możliwością wykorzystania oceny miRNA w monitorowaniu BE i diagnostyce EAC wykazały, że poziomy, będącego stymulującym wzrost oraz hamującym apoptozę onkogenem, miRNA 196a rosną w przebiegu sekwencji metaplastja-dysplazja-EAC, dzięki czemu ich ocena ilościowa pozwala na różnicowanie między LGD a HGD oraz HGD i EAC [43].

Utrzymanie struktury dojrzałych tkanek jest w znacznym stopniu zależne od funkcji kadheryn. Ekspresja E-kadheryny występuje w większości rodzajów nabłonka. Koekspresja z P-kadheryną jest charakterystyczna dla podstawnych warstw nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Funkcja adhezyjna kadheryny opiera się na

interakcji z kateninami. W wielu doniesieniach wskazywano na spadek ekspresji kadheryny w nowotworach. Również wyniki oceny ekspresji kadheryn i katenin w BE, towarzyszącej mu dysplazji i EAC wykazały występowanie nieprawidłowej ekspresji kadheryn i katenin w obrębie zmian dysplastycznych i nowotworowych związanych z BE. Dowiedzono znacznego spadku ekspresji E-kadheryny i translokację jądrową β -katenin w przebiegu progresji w sekwencji metaplastji-EAC. Natomiast ekspresja P-kadheryny jest wyraźna w podstawnej warstwie prawidłowego nabłonka płaskiego przełyku. Zwykle nie występuje w BE i związanej z nią dysplazji, ale jej ekspresja ponownie pojawia się w większości przypadków EAC, zwłaszcza w obrębie krawędzi guza [4, 35, 41]. Wskazuje to na przydatność tych kadheryn jako markerów wspomagających wczesną diagnostykę EAC i różnicowanie go na tle zmian dysplastycznych.

Receptor epidermalnego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor – EGFR), został uznany za jeden z najbardziej obiecujących biomarkerów molekularnych w monitorowaniu progresji BE, ze względu na silnie zaznaczoną w badaniach immunohistochemicznych ekspresję [9, 27]. Zaobserwowano wyraźny wzrost intensywności barwienia immunohistochemicznego w czasie rozwoju progresji nowotworowej towarzyszącej temu schorzeniu. Co ważne, oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem pełnych wycinków tkanek z BE, HGD i EAC. Ich wyniki wykazały stopniowy wzrost ekspresji EGFR, który potwierdza, że marker ten ulega nadekspresji tkankowej wraz z nasileniem procesu nowotworowego w tkankach BE, HGD i EAC. Ponadto stwierdzono, że barwienie EGFR było intensywniejsze również w tkankach sąsiadujących z HGD/rakiem. Nasilenie jego ekspresji w EAC jest kilkunastokrotnie wyższe niż w BE. Zatem może się okazać użytecznym histologicznym markerem nasilenia tego schorzenia [12]. Inne badanie wskazuje na istnienie znaczącej różnicy w poziomie ekspresji EGFR między LGD a HGD [39].

Cyklooksigenaza-2 (COX-2) jest enzymem, który odgrywa istotną rolę w rozwoju procesów zapalnych i nowotworowych. Przez wytwarzanie prostaglandyn pozytywnie wpływa na nasilenie proliferacji komórek nowotworowych i angiogenezę oraz hamowanie apoptozy, nasilając inwazyjność nowotworów złośliwych. Odgrywa także ważną rolę w rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego [7, 39]. Może się dzięki temu okazać markerem użytecznym przy różnicowaniu HGD od EAC oraz przy stratyfikacji pacjentów z BE oraz ocenie ryzyka progresji choroby [7, 11]. Wykazano, że jej ekspresja progresywnie wzrasta, gdy nabłonek płaski przekształca się w metaplastyczny walcowaty nabłonek Barretta, a następnie w HGD, ale wydaje się obniżać, kiedy zaczyna się rozwijać EAC [7]. Późniejsze badania dowiodły, iż w przebiegu progresji choroby występuje istotna różnica między poziomem ekspresji tkankowej tego enzymu w LGD i HGD [39].

Szlak antyapoptotyczny IL-6/STAT3 ulega aktywacji pod wpływem kwasów żółciowych i niskiego pH treści refluksowej. Pod ich wpływem objęte metaplastją tkanki

wydzielają IL-6 i syntetyzują białka związane ze szlakiem sygnalizacyjnym IL-6, w tym receptor IL-6, aktywowane przekaźniki sygnałowe, czynnik transkrypcji 3 (signal-transducer and activator of transcription 3 – STAT3) oraz białka antyapoptotyczne Bax, Bcl-XL i Mcl-1. Zmiana ta, jeżeli utrzymuje się stale, może leżeć u podstaw rozwoju dysplastycznego BE i jego transformacji w EAC. Analiza immunohistochemiczna wskazuje, że aktywowany fosforylowany czynnik transkrypcyjny 3 (pSTAT3) wykazuje wysoką, wzrastającą w miarę progresji choroby, ekspresję jądrową w dysplastycznym BE i tkankach EAC. Można zauważyć, iż nasilenie ekspresji hamującego apoptozę pSTAT3 w komórkach EAC jest wyższe niż w HGD, natomiast w HGD – wyższe niż w LGD [16]. Powstaje zatem sugestia, że ocena nasilenia ekspresji czynnika STAT3 może się okazać markerem pozwalającym na rozróżnienie EAC od HGD oraz HGD od LGD.

Białka związane z niedotlenieniem uczestniczą w progresji wielu nowotworów, ale ich udział w kancerogenezie Barretta pozostaje stosunkowo słabo poznany. Najnowsze badania wykazały, że zmiany poziomu tkankowych markerów związanych z niedotlenieniem występują również w EAC. Późne pojawienie się ekspresji białka aktywowanego niedotlenieniem 2α (hypoxia inducible factor 2α – HIF- 2α), w przebiegu progresji BE i jego zawartość w EAC sugeruje, że dalsze badania, pod kątem wykorzystania, jako wskaźnika zaawansowania choroby i cel terapii mogą przynieść obiecujące rezultaty. Zmiany poziomu ekspresji HIF-1 i HIF- 2α oraz receptora erytropoetyny w przebiegu transformacji nowotworowej związanej z metaplazją Barretta wskazują, że białka te mogą być przydatne również jako markery różnicujące HGD i EAC. Wzrost ich ekspresji w EAC jest bowiem zauważalnie wyższy w porównaniu do odnotowanego u pacjentów z HGD. Największe różnice poziomów ekspresji między HGD a rakiem stwierdzono w HIF- 2α , dlatego białko to ma największe w tej grupie potencjał, jako marker przydatny w różnicowaniu HGD i EAC [24].

Receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu (urokinase receptor – uPAR) wykazywał nasiloną ekspresję w populacji komórek EAC oraz towarzyszących im makrofagach i fibroblastach, zarówno na powierzchni, jak i w rejonie rdzenia guza. W komórkach z niedysplastycznym BE, jak i z HGD przylegających do komórek nowotworowych nie stwierdzono ekspresji uPAR. Obecnie wiadomo, że pojawia się na późnym etapie procesu nowotworzenia. Wysoka lokalna ekspresja uPAR wydaje się swoistym znacznikiem inwazyjnego zachowania komórek nowotworowych [38]. Zatem wskaźnik score uPAR może być użytecznym parametrem wystąpienia inwazji i różnicowania między HGD i EAC u pacjentów z BE.

Transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor – TGF- β), jest zaangażowany w rozwój nowotworów przewodu pokarmowego. Guzom tym często współtowarzyszą mutacje powodujące inaktywację kaskady sygnalizacyjnej TGF- β . Badania nad ekspresją mRNA białek wchodzących w skład szlaku sygnałowego TGF- β

w sekwencji metaplazja-dysplazja-EAC dowiodły, iż w czasie progresji choroby zmniejsza się ekspresja mRNA wielu białek tego szlaku. Przynoszą one zarazem wiele domniemyanych markerów, które mogłyby w przyszłości się okazać pomocne w rozpoznawaniu EAC u osób ze zdiagnozowaną HGD, towarzyszącą BE. Wyniki badań wskazują na sukcesywny spadek ekspresji mRNA i białka wewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej SMAD4 na wszystkich kolejnych etapach nasilenia BE, osiągając najniższy – w porównaniu do zdrowej tkanki – w HGD, po czym zauważalnie wzrasta w EAC do wartości porównywalnych z LGD. Odpowiadają za to różne mechanizmy, w tym metylacji, delecji i potranslacyjnej modyfikacji białek [49]. W związku z tym może się okazać markerem przydatnym w trakcie różnicowania LGD i HGD oraz HGD i EAC.

Komórkowa cząsteczka adhezyjna 6 związana z antygenem karcynoembrionalnym (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule-6 – CEACAM6) jest białkiem należącym do rodziny antygenów karcynoembrionalnych, której członkami są zakotwiczone w glikofosfatydyloinozytolu glikoproteiny powierzchniowe odpowiedzialne za adhezję komórkową. Ekspresja CEACAM6 nasilała się podczas rozwoju BE w obrębie nabłonka wyściełanego nabłonkiem walcowatym, a następnie istotnie zmniejsza się w przebiegu dysplazji i EAC. Przyjmuje się, że ocena ekspresji tej cząsteczki ułatwia wykrycie obecności zmian dysplastycznych na tle BE. Nie podjęto jednak próby oceny ekspresji tej proteiny w poszczególnych etapach dysplazji towarzyszących progresji BE, dlatego nie można wykluczyć, iż marker ten może się również okazać skutecznym narzędziem różnicowania IND lub LGD od HGD [57].

GATA6 jest członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych GATA, stanowiących grupę ewolucyjnie zachowanych regulatorów transkrypcji. Odgrywają główną rolę w rozwoju i różnicowaniu narządów endodermalnych wszystkich organizmów eukariotycznych. Jego ekspresja stopniowo zwiększa się podczas rozwoju BE i jego transformacji do EAC. Nie stwierdzono wartości prognostycznej ekspresji GATA6 w EAC. W dotychczasowych badaniach nie oceniano szczegółowo poziomu ekspresji we wszystkich stadiach dysplazji towarzyszącej BE. Tym niemniej stwierdzone w badaniach zmiany ekspresji tego białka w komórkach nabłonka przełyku w czasie progresji choroby pozwalają przypuszczać, iż może się ono okazać przydatne w różnicowaniu poszczególnych etapów dysplazji w przebiegu BE [51].

CSE1L/CAS jest białkiem o wielu funkcjach, które odgrywa istotną rolę w apoptozie, przeżyciu komórek, składaniu chromosomów, transporcie nukleocytoplazmatycznym, mikroangiogenezie i przerzutach nowotworowych. Niektóre jego funkcje są wyraźnie skorelowane. Badania nad jego ekspresją w przebiegu progresji BE wykazały, że nie występowała ona w niedysplastycznej metaplazji, w LGD była podwyższona, a obecności HGD i EAC towarzyszyła wyraźna nadekspresja tego białka. Różnice zaobserwowano również w jego umiejscowieniu komór-

kowym. W niedysplastycznym BE występowało ono przede wszystkim w jądrach komórkowych w LGD i HGD, w jądrach i cytoplazmie, a w EAC dominowała ekspresja cytoplazmatyczna. Podobny postępujący wzrost zaobserwowano dla aktywności ekspresji genu tego białka. Zmiany aktywności ekspresji CAS/CSE1L podczas progresji BE do dysplazji i EAC oraz jego umiejscowienie mogą się okazać przydatne w diagnostyce różnicowej IND i HGD, HGD i EAC, a w przyszłości stanowić marker prognostyczny w leczeniu pacjentów z BE [30].

PODSUMOWANIE

Gruczołakorak przełyku należy do najpowszechniej występujących guzów złośliwych przewodu pokarmowego. Częstotliwość zachorowań na ten nowotwór w Europie Zachodniej i USA wzrasta szybciej niż w przypadku jakiegokolwiek innego raka. Jedynym znanym jego prekursorem jest BE. Wraz z nasilaniem się zmian dysplastycznych towarzyszących temu schorzeniu ryzyko rozwinięcia się EAC wzrasta. Stadium bezpośrednio poprzedzającym wystąpienie tego nowotworu jest HGD. Dlatego wraz ze zdiagnozowaniem dysplazji najważniejsze jest jej monitorowanie pod kątem występowania jej progresji, które w pewnych przypadkach bywa problematyczne. W związku z tym istotne wydaje się wykorzystanie czułych i swoistych markerów, które pozwalają we wszystkich przypadkach, gdy nie można wyłącznie w oparciu o badanie histopatologiczne postawić jednoznacznej diagnozy, precyzyjnie określić, na jakim stadium znajduje się u danego pacjenta dysplazja bądź stwierdzić obecność wczesnych ognisk EAC u pacjentów ze zdiagnozowaną HGD. Precyzyjna ocena, który spośród typów dysplazji w BE występuje, zwłaszcza w przypadku występowania niejednoznacznych cech budowy histologicznej bądź stwierdzenie, czy w pobranych bioptacie ma się do czynienia wyłącznie z HGD, czy już z ogniskami raka jest niezwykle ważna dla pacjenta. Prawidłowa diagnostyka różnicowa oraz wczesne wykrycie ognisk nowotworu złośliwego pozwala bowiem na wcześniejsze wdrożenie odpowiednich metod postępowania i korzystnie wpływa na rokowanie.

Badanie histopatologiczne jest uważane za złoty standard w ocenie progresji u chorych z BE. Histologiczną klasyfikację dysplazji cechuje duża użyteczność kliniczna w stratyfikacji pacjentów z BE i ocenie ryzyka progresji. Jednak ten sposób określania stopnia dysplazji nadal pozostaje czynnością subiektywną, w dużym stopniu zależną od wiedzy i doświadczenia osoby przeprowadzającej badanie. Wśród doświadczonych patomorfologów również zdarzają się rozbieżności w ocenie stopnia dysplazji. Wiąże się to z podwyższonym ryzykiem postawienia nieprawidłowego rozpoznania, zwłaszcza poza wyspecjalizowanymi ośrodkami, posiadającymi ekspertów w dziedzinie patomorfologii przewodu pokarmowego. Nieprecyzyjna klasyfikacja histopatologiczna jest czynnikiem, który powinien pobudzić wysiłki nad badaniami w kierunku bardziej obiektywnych molekularnych i tkankowych markerów stopnia progresji oraz stopnia

ryzyka jej dalszego rozwoju u pacjentów z BE. Uzupełnienie oceny histologicznej o wykorzystanie markerów molekularnych i tkankowych może pomóc w stratyfikacji pacjentów z postępującym BE.

Liczba markerów przebadanych pod kątem użyteczności podczas różnicowania poszczególnych typów dysplazji towarzyszących metaplazji Barretta oraz HGD i EAC nadal pozostaje stosunkowo niewielka. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących markerów tkankowych i molekularnych wskazują na realną przydatność oceny nasilenia ekspresji pH3 [23], Glut-1 [73], MUC1 [8], Ki-67 [27, 52], CTNNB1 [4, 34], p53 [34, 65], CCND 1 i ERBB2 [65] oraz panelu białek: CDX2 [32, 68], p120ctn, c-Myc i Jagged1 [32], a także IMP3 [20], TGR5 [42] i AMACR [14, 40, 56] jako tkankowych biomarkerów pomocniczych, wspomagających badanie histopatologiczne, pozwalających na różnicowanie między różnymi stadiami dysplazji bądź HGD i EAC, w materiałach pochodzących z biopsji błony śluzowej przełyku od pacjentów z BE. Oprócz przydatności w diagnostyce i różnicowaniu poszczególnych etapów dysplazji BE ocena ekspresji p53 [41, 72], CTNNB1 [41], cykliny A i D1 [35, 66], HER2/neu i HER3 [17], IMP3 [20], Ki-67 [41], AMACR [20] i TGR5 [42] pozwala również na ocenę ryzyka dalszego rozwoju choroby i oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia nowotworu. W dziedzinie biologii molekularnej stwierdzono, iż utrata 7q33-q35 może być nowym markerem, pozwalającym rozróżnić LGD od HGD, natomiast utrata 16q21-q22 oraz nasilenie amplifikacji 20q11.2-q23.1 pozwalają na potwierdzenie obecności ognisk raka u osób z HGD [55].

Oprócz wymienionych wyżej markerów istnieje liczna grupa białek i genów, których aktywność ekspresji ulega zauważalnym zmianom w przebiegu rozwoju dysplazji oraz wczesnych stadiów EAC [19, 29, 64]. Zdaniem badaczy wiele z nich może się okazać markerami przydatnymi w diagnozowaniu dysplazji lub wczesnych stadiów raka Barretta. Część z nich została już włączona do rutynowej diagnostyki BE i EAC jako markery diagnostyczne, prognostyczne, progresji i predykcyjne [6, 11, 19, 41, 53, 54, 59, 66, 69, 74]. Jak dotąd nie oceniano ich jednak pod kątem wykorzystania w różnicowaniu poszczególnych typów dysplazji oraz EAC na tle HGD. Niektóre z nich mogą się okazać pomocne w tym procesie. Na podstawie przeglądu literatury, za markery o największym potencjale w diagnostyce różnicowej typów dysplazji, a także HGD i EAC można uznać: FGF-1 [58], E-kadherynę [4], EGFR [12, 39], COX-2 [7, 39], LI-kadherynę [68], CDX1 [61], pSTAT3 [16], HIF-1 α , HIF-2 α [24], CEACAM6 [57], GATA6 [51], CAS/CSE1L [30] i uPAR [38], a także analizę ilościową poziomu miRNA 196a [64], ocenę ekspresji mRNA oraz białka należącego do szlaku sygnałowego TGF- β czynnika SMAD4 [19] i cytometryczną analizę DNA pod kątem wykrywania aneuploidii w bioptatach [44].

Odkrycie, walidacja i wdrożenie do rutynowej diagnostyki czułych i swoistych biomarkerów korelujących z histologiczną progresją BE, umożliwiających różnicowanie między poszczególnymi typami dysplazji oraz między

dysplazją i rakiem może zapewnić jednolitość interpretacji histologicznej stopnia zaawansowania dysplazji w BE. W przyszłości powinno to zwiększyć postawienie precyzyjnej i jednoznacznej diagnozy wszędzie tam, gdzie nie można tego wykonać konwencjonalnymi metodami oceny histopatologicznej. Bezpośrednim tego skutkiem będzie sprawniejsze monitorowanie pacjentów z postępującymi zmianami dysplastycznymi w przebiegu BE. Nowe markery, oprócz zdolności wykrywania obecności dysplazji oraz korelacji aktywności ekspresji z histologicznymi stopniami dysplazji, docelowo powinny również sprawdzać się w predykcji ryzyka wystąpienia EAC, co w przypadku niektórych z nich zostało już potwierdzone [55, 57, 61]. Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż wprowadzenie ich do rutynowej diagnostyki, usprawni wczesną diagnostykę, stratyfikację i monitorowanie dysplazji rozwijającej się u pacjentów z BE oraz poprawi wykrywalność wczesnych ognisk EAC u pacjentów ze zdiagnozowaną dysplazją. To powinno spowodować zmniejszenie odsetka pacjentów z niezdiagnozowanym wczesnym stadium raka przełyku. Szybsze wykrywanie obecności nowotworu złośliwego u pacjentów z BE, umożliwi wcześniejsze postawienie właściwego rozpoznania i wdrożenie odpowiednich metod postępowania, co powinno znacznie poprawić rokowania chorych w chwili zdiagnozowania EAC. Wzrost odsetka tego

nowotworu rozpoznanego we wczesnych stadiach jego rozwoju powinien także zwiększyć liczbę pacjentów kwalifikujących się do leczenia radykalnego i mających szansę na całkowite wyleczenie, zmniejszyć ryzyko wystąpienia u nich przerzutów oraz powikłań, jak również wydłużyć bardzo krótki czas przeciętnego przeżycia chorych z EAC, czy poprawie ich jakości życia. Rozwój diagnostyki różnicowej typów dysplazji i EAC, oprócz poprawy wykrywalności, z biegiem czasu powinien zaowocować obniżeniem średniej śmiertelności pacjentów z EAC, wzrostem średniej 5-letniej przeżywalności osób z tym typem nowotworu. W dalszej perspektywie może także zmniejszyć częstość występowania tego nowotworu, ponieważ żaden marker nie został dotąd zwalidowany, jako w pełni korelujący z histologicznymi stadiami rozwoju BE i pozwalający na różnicowanie zmian dysplastycznych i EAC. Dlatego wszelkie dalsze badania będą tworzyły podwaliny do dalszego rozwoju tej gałęzi diagnostyki histopatologicznej, będąc podstawą do poszukiwania kolejnych tego rodzaju biomarkerów. Powinny również pozwolić na lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój BE i towarzyszących mu dysplazji oraz raka, co w przyszłości może się także okazać pomocne w rozwoju nowych kierunków zwalczania tego schorzenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdel-Latif M.M., Windle H., Terres A., Eidhin D.N., Kelleher D., Reynolds J.V.: *Helicobacter pylori* extract induces nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and cyclooxygenase-2 in esophageal epithelial cells. *J. Gastrointest. Surg.*, 2006; 10: 551–562
- [2] Altaf K., Xiong J.J., la Iglesia D., Hickey L., Kaul A.: Meta-analysis of biomarkers predicting risk of malignant progression in Barrett's esophagus. *Br. J. Surg.*, 2017; 104: 493–502
- [3] Baghdadi J., Chaudhary N., Pei Z., Yang L.: Microbiome, innate immunity, and esophageal adenocarcinoma. *Clin. Lab. Med.*, 2014; 34: 721–732
- [4] Bailey T., Biddlestone L., Shepherd N., Barr H., Warner P., Jankowski J.: Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am. J. Pathol.*, 1998; 152: 135–144
- [5] Booth C.L., Thompson K.S.: Barrett's esophagus: A review of diagnostic criteria, clinical surveillance practices and new developments. *J. Gastrointest. Oncol.*, 2012; 3: 232–242
- [6] Cardoso J., Mesquita M., Dias Pereira A., Bettencourt-Dias M., Chaves P., Pereira-Leal J.B.: CYR61 and TAZ upregulation and focal epithelial to mesenchymal transition may be early predictors of Barrett's esophagus malignant progression. *PLoS One*, 2016; 11: e0161967
- [7] Cheong E., Igali L., Harvey I., Mole M., Lund E., Johnson I.T., Rhodes M.: Cyclo-oxygenase-2 expression in Barrett's esophageal carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003; 17: 379–386
- [8] Chinyama C.N., Marshall R.E., Owen W.J., Mason R.C., Kothari D., Wilkinson M.L., Sanderson J.D.: Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in Barrett's metaplasia, dysplasia and adenocarcinoma: an immunopathological study with clinical correlation. *Histopathology*, 1999; 35: 517–524
- [9] Chu Y.X., Wang W.H., Dai Y., Teng G.G., Wang S.J.: Esophageal *Helicobacter pylori* colonization aggravates esophageal injury caused by reflux. *World J. Gastroenterol.*, 2014; 20: 15715–15726
- [10] Ciriza-de-los-Ríos C.: Barrett's esophagus - a review. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2010; 102: 257–269
- [11] Critchley-Thorne R.J., Duits L.C., Prichard J.W., Davison J.M., Jobe B.A., Campbell B.B., Zhang Y., Repa K.A., Reese L.M., Li J., Diehl D.L., Jhala N.C., Ginsberg G., DeMarshall M., Foxwell T. i wsp.: A tissue systems pathology assay for high-risk Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2016; 25: 958–968
- [12] Cronin J., McAdam E., Danikas A., Tselepis C., Griffiths P., Baxter J., Thomas L., Manson J., Jenkins G.: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in high-grade dysplasia and adenocarcinoma of the esophagus and may represent a biomarker of histological progression in Barrett's esophagus (BE). *Am. J. Gastroenterol.*, 2011; 106: 46–56
- [13] di Pietro M., Alzoubaidi D., Fitzgerald R.C.: Barrett's esophagus and cancer risk: how research advances can impact clinical practice. *Gut Liver*, 2014; 8: 356–370
- [14] Dorer R., Odze R.D.: AMACR immunostaining is useful in detecting dysplastic epithelium in Barrett's esophagus, ulcerative colitis, and Crohn's disease. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2006; 30: 871–877
- [15] Duits L.C., Lao-Sirieix P., Wolf W.A., O'Donovan M., Galeano-Dalmau N., Meijer S.L., Offerhaus G.J., Redman J., Crawte J., Zeki S., Pouw R.E., Chak A., Shaheen N.J., Bergman J.J., Fitzgerald R.C.: A biomarker panel predicts progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Dis. Esophagus*, 2019; 32: 1–9
- [16] Dvorak K., Chavarria M., Payne C.M., Ramsey L., Crowley-Weber C., Dvorakova B., Dvorak B., Bernstein H., Holubec H., Sampliner R.E., Bernstein C., Prasad A., Green S.B., Garewal H.: Activation of the interleukin-6/STAT3 antiapoptotic pathway in esophageal cells by bile acids and low pH: relevance to Barrett's esophagus. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 5305–5313
- [17] Ecker B.L., Taylor L., Zhang P.J., Furth E.E., Ginsberg G.G., McMillan M.T., Datta J., Czerniecki B.J., Roses R.E.: HER3 expression is a marker of tumor progression in premalignant lesions of the gastroesophageal junction. *PLoS One*, 2016; 11: e0161781

- [18] El-Serag H.B., Hollier J.M., Gravitt P., Alsarraj A., Younes M.: Human papillomavirus and the risk of Barrett's esophagus. *Dis. Esophagus*, 2013; 26: 517-521
- [19] Fouad Y.M., Mostafa I., Yehia R., El-Khayat H.: Biomarkers of Barrett's esophagus. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.*, 2014; 5: 450-456
- [20] Gadara M.R., Gonzalez M., Cartun R.W., Ligato S.: IMP3 immunoreactivity is more sensitive than AMACR in detecting dysplastic epithelium and early adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2017; 25: 386-391
- [21] Gindea C., Birla R., Hoara P., Caragui A., Constantinoiu S.: Barrett esophagus: History, definition and etiopathogeny. *J. Med. Life*, 2014; 7: 23-30
- [22] Goldblum J.R.: Barrett's esophagus and Barrett's-related dysplasia. *Mod. Pathol.*, 2003; 16: 316-324
- [23] Goodarzi M., Correa A.M., Ajani J.A., Swisher S.G., Hofstetter W.L., Guha S., Deavers M.T., Rashid A., Maru D.M.: Anti-phosphorylated histone H3 expression in Barrett's esophagus, low-grade dysplasia, high-grade dysplasia, and adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*, 2009; 22: 1612-1621
- [24] Griffiths E.A., Pritchard S.A., McGrath S.M., Valentine H.R., Price P.M., Welch I.M., West C.M.: Increasing expression of hypoxia-inducible proteins in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Br. J. Cancer*, 2007; 96: 1377-1383
- [25] Grin A., Streutker C.J.: Histopathology in Barrett esophagus and Barrett esophagus-related dysplasia. *Clin. Endosc.*, 2014; 47: 31-39
- [26] Herbella F.A., Patti M.G.: Gastroesophageal reflux disease: From pathophysiology to treatment. *World J. Gastroenterol.*, 2010; 16: 3745-3749
- [27] Hong M.K., Laskin W.B., Herman B.E., Johnston M.H., Vargo J.J., Steinberg S.M., Allegra C.J., Johnston P.G.: Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer*, 1995; 75: 423-429
- [28] Horvath B., Singh P., Xie H., Thota P.N., Sun X., Liu X.: Expression of p53 predicts risk of prevalent and incident advanced neoplasia in patients with Barrett's esophagus and epithelial changes indefinite for dysplasia. *Gastroenterol. Rep.*, 2016; 4: 304-309
- [29] Jankowski J.A., Wright N.A., Meltzer S.J., Triadafilopoulos G., Geboes K., Casson A.G., Kerr D., Young L.S.: Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am. J. Pathol.*, 1999; 154: 965-973
- [30] Jiang K., Neill K., Cowden D., Klapman J., Eschrich S., Pimiento J., Malafa M.P., Coppola D.: Expression of CAS/CSE1L, the cellular apoptosis susceptibility protein, correlates with neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2018; 26: 552-556
- [31] Jin Z., Cheng Y., Gu W., Zheng Y., Sato F., Mori Y., Oлару A.V., Paun B.C., Yang J., Kan T., Ito T., Hamilton J.P., Selaru F.M., Agarwal R., David S. i wsp.: A multicenter, double-blinded validation study of methylation biomarkers for progression prediction in Barrett's esophagus. *Cancer Res.*, 2009; 69: 4112-4115
- [32] Karamchandani D.M., Lehman H.L., Ohanessian S.E., Massé J., Welsh P.A., Odze R.D., Goldblum J.R., Berg A.S., Stairs D.B.: Increasing diagnostic accuracy to grade dysplasia in Barrett's esophagus using an immunohistochemical panel for CDX2, p120ctn, c-Myc and Jagged1. *Diagn. Pathol.*, 2016; 11: 23
- [33] Kastelein F., Biermann K., Steyerberg E.W., Verheij J., Kalisvaart M., Looijenga L.H., Stoop H.A., Walter L., Kuipers E.J., Spaander M.C., Bruno M.J., ProBar Study Group: Value of α -methylacyl-CoA racemase immunochemistry for predicting neoplastic progression in Barrett's oesophagus. *Histopathology*, 2013; 63: 630-639
- [34] Keswani R.N., Noffsinger A., Waxman I., Bissonnette M.: Clinical use of p53 in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006; 15: 1243-1249
- [35] Kinra P., Gahlot G.P.S., Yadav R., Baloda V., Makharia G.K., Gupta S.D., Das P.: Histological assessment & use of immunohistochemical markers for detection of dysplasia in Barrett's esophageal mucosa. *Pathol. Res. Pract.*, 2018; 214: 993-999
- [36] Kountourakis P., Ajani J.A., Davila M., Lee J.H., Bhutani M.S., Izzo J.G.: Barrett's esophagus: A review of biology and therapeutic approaches. *Gastrointest. Cancer Res.*, 2012; 5: 49-57
- [37] Krishnamoorthi R., Lewis J.T., Krishna M., Crews N.J., Johnson M.L., Dierkhising R.A., Ginos B.F., Wang K.K., Wolfsen H.C., Fleischer D.E., Ramirez F.C., Buttar N.S., Katzka D.A., Iyer P.G.: Predictors of progression in Barrett's esophagus with low-grade dysplasia: Results from a multicenter prospective BE registry. *Am. J. Gastroenterol.*, 2017; 112: 867-873
- [38] Laerum O.D., Ovrebø K., Skarstein A., Christensen I.J., Alpízar-Alpízar W., Helgeland L., Danø K., Nielsen B.S., Illemann M.: Prognosis in adenocarcinomas of lower oesophagus, gastro-oesophageal junction and cardia evaluated by uPAR-immunohistochemistry. *Int. J. Cancer*, 2012; 131: 558-569
- [39] Li Y., Wo J.M., Ray M.B., Jones W., Su R.R., Ellis S., Martin R.C.: Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 928-934
- [40] Lisovsky M., Falkowski O., Bhuiya T.: Expression of α -methylacyl-coenzyme A racemase in dysplastic Barrett's epithelium. *Hum. Pathol.*, 2006; 37: 1601-1606
- [41] Ma C., Pai R.K.: Predictive value of immunohistochemistry in pre-malignant lesions of the gastrointestinal tract. *Semin. Diagn. Pathol.*, 2015; 32: 334-343
- [42] Marketkar S., Li D., Yang D., Cao W.: TGR5 expression in benign, preneoplastic and neoplastic lesions of Barrett's esophagus: Case series and findings. *World J. Gastroenterol.*, 2017; 23: 1338-1344
- [43] Maru D.M., Singh R.R., Hannah C., Albarracín C.T., Li Y.X., Abraham R., Romans A.M., Yao H., Luthra M.G., Anandasabapathy S., Swisher S.G., Hofstetter W.L., Rashid A., Luthra R.: MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *Am. J. Pathol.*, 2009; 174: 1940-1948
- [44] Montgomery E.A., Hartmann D.P., Carr N.J., Holterman D.A., Sobin L.H., Azumi N.: Barrett esophagus with dysplasia. Flow cytometric DNA analysis of routine, paraffin-embedded mucosal biopsies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996; 106: 298-304
- [45] Morrow D.J., Avissar N.E., Toia L., Redmond E.M., Watson T.J., Jones C., Raymond D.P., Little V., Peters J.H.: Pathogenesis of Barrett's esophagus: bile acids inhibit the Notch signaling pathway with induction of CDX2 gene expression in human esophageal cells. *Surgery*, 2009; 146: 714-721
- [46] Naini B.V., Souza R.F., Odze R.D.: Barrett's esophagus: A comprehensive and contemporary review for pathologists. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2016; 40: e45-e66
- [47] Odze R.D.: Diagnosis and grading of dysplasia in Barrett's esophagus. *J. Clin. Pathol.*, 2006; 59: 1029-1038
- [48] Oh D.S., Demeester S.R.: Pathophysiology and treatment of Barrett's esophagus. *World J. Gastroenterol.*, 2010; 16: 3762-3772
- [49] Onwuegbusi B.A., Aitchison A., Chin S.F., Kranjac T., Mills I., Huang Y., Lao-Sirieix P., Caldas C., Fitzgerald R.C.: Impaired transforming growth factor β signalling in Barrett's carcinogenesis due to frequent SMAD4 inactivation. *Gut*, 2006; 55: 764-774
- [50] Ozcan H.E., Anuk T., Ozden O.: Expression profile and cellular localizations of mucin proteins, CK7, and cytoplasmic p27 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Adv. Med. Sci.*, 2018; 63: 296-300
- [51] Pavlov K., Honing J., Meijer C., Boersma-van Ek W., Peters F.T., van den Berg A., Karrenbeld A., Plukker J.T., Kruyt F.A., Kleibeuker J.H.: GATA6 expression in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dig. Liver Dis.*, 2015; 47: 73-80

- [52] Quante M., Bhagat G., Abrams J.A., Marache F., Good P., Lee M.D., Lee Y., Friedman R., Asfaha S., Dubeykovskaya Z., Mahmood U., Figueiredo J.L., Kitajewski J., Shawber C., Lightdale C.J. i wsp.: Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*, 2012; 21: 36–51
- [53] Rajendra S., Wang B., Snow E.T., Sharma P., Pavey D., Merrett N., Ball M.J., Brain T., Fernando R., Robertson I.K.: Transcriptionally active human papillomavirus is strongly associated with Barrett's dysplasia and esophageal adenocarcinoma. *Am. J. Gastroenterol.*, 2013; 108: 1082–1093
- [54] Rajendra S., Yang T., Xuan W., Sharma P., Pavey D., Lee C.S., Le S., Collins J., Wang B.: Active human papillomavirus involvement in Barrett's dysplasia and oesophageal adenocarcinoma is characterized by wild-type p53 and aberrations of the retinoblastoma protein pathway. *Int. J. Cancer*, 2017; 141: 2037–2049
- [55] Riegman P.H. Vissers K.J., Alers J.C., Geelen E., Hop W.C., Tilanus H.W., van Dekken H.: Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3164–3170
- [56] Scheil-Bertram S., Lorenz D., Ell C., Sheremet E., Fisseler-Eckhoff A.: Expression of α -methylacyl coenzyme A racemase in the dysplasia carcinoma sequence associated with Barrett's esophagus. *Mod. Pathol.*, 2008; 21: 961–967
- [57] Sharma N., Srivastava S., Kern F., Xian W., Yeoh K.G., Ming T., McKeon F., Ho K.Y.: CEACAM 6, a novel marker for the diagnosis of Barrett's esophagus. *Dis. Esophagus*, 2017; 30: 1–5
- [58] Soslow R.A., Ying L., Altorki N.K.: Expression of acidic fibroblast growth factor in Barrett's esophagus and associated esophageal adenocarcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1997; 114: 838–843
- [59] Souza R.F.: Biomarkers in Barrett's esophagus. *Tech. Gastrointest. Endosc.*, 2010; 12: 116–1212
- [60] Souza R.F., Krishnan K., Spechler S.J.: Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2008; 295: G211–G218
- [61] Stairs D.B., Nakagawa H., Klein-Szanto A., Mitchell S.D., Silberg D.G., Tobias J.W., Lynch J.P., Rustgi A.K.: Cdx1 and c-Myc foster the initiation of transdifferentiation of the normal esophageal squamous epithelium toward Barrett's esophagus. *PLoS One*, 2008; 3: e3534
- [62] Tamagawa Y., Ishimura N., Uno G., Yuki T., Kazumori H., Ishihara S., Amano Y., Kinoshita Y.: Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of Barrett's esophagus. *Lab. Invest.*, 2012; 92: 896–909
- [63] Thota P.N., Kistangari G., Esnakula A.K., Gonzalo D.H., Liu X.L.: Clinical significance and management of Barrett's esophagus with epithelial changes indefinite for dysplasia. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 2016; 7: 406–411
- [64] Tselepis C., Perry I., Jankowski J.: Barrett's esophagus: dysregulation of cell cycling and intercellular adhesion in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Digestion*, 2000; 61: 1–5
- [65] van Dekken H., Hop W.C., Tilanus H.W., Haringsma J., van der Valk H., Wink J.C., Vissers K.J.: Immunohistochemical evaluation of a panel of tumor cell markers during malignant progression in Barrett esophagus. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008; 130: 745–753
- [66] van Olphen S.H., Ten Kate F.J., Doukas M., Kastelein F., Steyerberg E.W., Stoop H.A., Spaander M.C., Looijenga L.H., Bruno M.J., Biermann K., ProBar Study Group: Value of cyclin A immunohistochemistry for cancer risk stratification in Barrett esophagus surveillance: A multicenter case-control study. *Medicine*, 2016; 95: e5402
- [67] Volkweis B.S., Gurski R.R., Meurer L., Pretto G.G., Mazzini Gda S., Edelweiss M.I.: Ki-67 antigen overexpression is associated with the metaplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's esophagus. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2012; 2012: 639748
- [68] Weimann A., Zimmermann M., Gross M., Slevogt H., Rieger A., Morawietz L.: CDX2 and LI-cadherin expression in esophageal mucosa: use of both markers can facilitate the histologic diagnosis of Barrett's esophagus and carcinoma. *Int. J. Surg. Pathol.*, 2010; 18: 330–337
- [69] Williams L.J., Guernsey D.L., Casson A.G.: Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Curr. Oncol.*, 2006; 13: 33–43
- [70] Wiseman E.F., Ang Y.S.: Risk factors for neoplastic progression in Barrett's esophagus. *World J. Gastroenterol.*, 2011; 17: 3672–3683
- [71] Wong N.A., Wilding J., Bartlett S., Liu Y., Warren B.F., Piris J., Maynard N., Marshall R., Bodmer W.F.: CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 7565–7570
- [72] Younes M., Brown K., Lauwers G.Y., Ergun G., Meriano F., Schmulen A.C., Barroso A., Ertan A.: p53 protein accumulation predicts malignant progression in Barrett's metaplasia: a prospective study of 275 patients. *Histopathology*, 2017; 71: 27–33
- [73] Younes M., Ertan A., Lechago L.V., Somoano J., Lechago J.: Human erythrocyte glucose transporter (Glut1) is immunohistochemically detected as a late event during malignant progression in Barrett's metaplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1997; 6: 303–305
- [74] Zagorowicz E., Jankowski J.: Molecular changes in the progression of Barrett's oesophagus. *Postgrad. Med. J.*, 2007; 83: 529–535

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.