

# Ekspresija MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, p53 u različitim stadijima razvoja Barrett-ovog jednjaka od metaplazije do adenokarcinoma jednjaka

---

**Markoš, Pave**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:005840>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

PAVE MARKOŠ, doktor medicine

EKSPRESIJA MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, p53 U RAZLIČITIM STADIJIMA RAZVOJA  
BARRETT-ovog JEDNJAKA OD METAPLAZIJE DO ADENOKARCINOMA JEDNJAKA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2018.g

Rad je izrađen u Centru Interventne gastroenterologije, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj istraživanja:

Prof.dr.sc. Roland Pulanić  
Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju  
Klinika za unutarnje bolesti  
Klinički bolnički Centar Zagreb

Za izradu ovog rada zahvaljujem svim članovima Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju te Zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, a posebna zahvala na ideji i vrijednim savjetima je upućena profesorici Jasminki Jakić Razumović te profesoru i mentoru Rolandu Pulaniću.

Disertaciju posvećujem svojim najmilijima, supruzi Ines te djeci Jakovu, Frani i Paoli.

## SADRŽAJ

1. UVOD	7
1.1 EPIDEMIOLOGIJA	8
1.1.1. Sjeverna Amerika	9
1.1.2. Južna Amerika	9
1.1.3. Europa	9
1.1.4. Australija	10
1.1.5. Azija	10
1.1.6. Bliski istok i Afrika	10
1.2 RIZIČNI ČIMBENICI ZA NASTANAK BARRETT-ovog JEDNJAKA	11
1.3 PATOGENEZA I PATOFIZIOLOGIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA	12
1.4 BIOLOGIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA	15
1.5 PRIRODNI TIJEK BARRETT-ovog JEDNJAKA I ČIMBENICI PROGRESIJE BOLESTI	17
1.5.1 Čimbenici rizika od strane pacijenta	17
1.5.2 Endoskopski čimbenici rizika	19
1.5.3 Patohistološka analiza-čimbenici rizika	20
1.5.4 Biomarkeri	21
1.6 DIJAGNOZA BARRETT-ovog JEDNJAKA UZ KROMOENDOSKOPIJU	
1.6.1 Kromoendoskopija i nove dijagnostičke tehnike	24-26
1.7 TERAPIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA	30
1.7.1 Terapija bolesnika sa displazijom epitela visokog stupnja	31
1.8 ENDOSKOPSKO PRAĆENJE	36
1.9 SUSTAV POPRAVKA POGREŠNO SPARENIH BAZA	37
2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	44
3 USTROJ ISTRAŽIVANJA	44
4 ISHOD ISTRAŽIVANJA	44
5 MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	45
6 REZULTATI	47
7 RASPRAVA	65
8 ZAKLJUČAK	70
9 SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	72

10 SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU	72
11 POPIS LITERATURE	74
12 ŽIVOTOPIŠ	93

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AFI	Autoflorescenca (od engl „Autofluorescence“)
AGA	Američko gastroenterološko društvo (od engl „American gastroenterological association“)
ASGE	Američko udruženje gastrointestinalne endoskopije (od engl „American society of Gastroenterological endoscopy“)
BE	Barrett-ov jednjak (od engl „Barrett esophagus“)
BMI	Indeks tjelesne mase (od engl „Body mass index“)
BRAF	Proto onkogen B-Raf
BSG	Britansko gastroenterološko društvo (od engl „British society of Gastroenterology“)
CDX1	„Caudal type homeobox-1“
CDX2	„Caudal type homeobox-2“
DES	Donji ezofagealni sfinkter
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (od engl „Deoxyribonucleic acid“)
EGFR	Receptor epidermalnog čimbenika rasta (od engl „Epidermal growth factor receptor“)
EMR	Endoskopska mukozna resekcija (od engl „Endoscopic mucosal resection“)
FISH	Fluorescentna in situ hibridizacija (od engl „Fluorescence in situ hybridisation“)
GEJ	Gastroezofagealni spoj (od engl „gastroesophageal junction“)
GERB	Gastroezofagealna refluksna bolest
GI	Gastroenterološki (od engl Gastrointestinal“)
HGD	Displazija visokog stupnja (od engl „high grade dysplasia“)
HNPCC	Nasljedni nepolipozni karcinom kolona (od engl „Hereditary non-polyposis colorectal cancer“)
IGF-1	Inzulinu sličan faktor rasta 1 (od engl „Insulin like growth factor-1“)
IL-6	Interleukin 6 (od engl „Interleukin-1“)
IPP	Inhibitor protonske pumpe
Ki-67	od engl „nuclear protein Ki-67“
KRAS	KRAS gen
KRK	Kolorektalni karcinom
LGD	Displazija niskog stupnja (od engl „low-grade dysplasia“)

LSBE	Dugački Barrett jednjak (od engl „long segment Barrett esophagus“)
MLH1	od engl „MutL homolog 1“
MMR	Sustav popravka krivo sparenih baza (od engl „Mismatch reparis system“)
MSH2	od engl „MutS homolog 2“
MSH6	od engl „MutS homolog 6“
MUC2	od engl „Mucin 2“
NAB	Noćno povećanje kiseline (od engl „Nocturnal acid breakthrough“)
NBI	Pregled uskopojasnim spektrom (od engl „Narrow band imaging“)
P53	od engl „tumor protein p53“
PMS2	od engl „postmeiotic segregation 2“
RFA	Radiofrekventna ablacija (od engl „Radiofrequency ablation“)
SSBE	Kratki Barrett jednjak (od engl „Short segment Barrett esophagus“)
SOX9	od engl „transcription factor SOX-9“
TNF $\alpha$	od engl „tumor necrosis factor alfa“
UEGW	od engl „United european gastroenterology week“

## 1. UVOD

Barrett-ov jednjak (engleski Barrett's esophagus, BE) se u literaturi najčešće definira kao stanje kod kojeg je višeslojni pločasti epitel, koji inače oblaže distalni jednjak, zamijenjen metaplastičnim želučanim epitelom.<sup>1-4</sup> Sama definicija je teže prihvatljiva u kliničkoj praksi iz dva razloga:

1. nema jasno definiranog i prihvaćenog endoskopskog obilježja koji bi predstavljao jasnu granicu gdje završava jednjak a započinje želudac
2. nema adekvatnog načina potvrde da je želučani tip epitela koji se pronađe u distalnom dijelu jednjaka metaplastični

Dijagnoza BE se postavlja kombinacijom endoskopske pretrage i patohistološkog nalaza. Endoskopski, na BE se može posumnjati kada se prikaže želučani epitel u jednjaku iznad gastroezofagealnog spoja (engleski – gastroesophageal junction-GEJ) pod uvjetom da se GEJ može adekvatno identificirati ili dobro prikazati. Endoskopičari zapadne hemisfere GEJ definiraju kao proksimalni kraj želučanih nabora,<sup>5</sup> dok endoskopičari Azije i Istočnih zemalja GEJ definiraju kao distalni kraj palisadnih krvnih žila jednjaka.<sup>6,7</sup> Vrh želučanih nabora je pod utjecajem respiracije, motorne aktivnosti želuca te distenzije želuca i jednjaka tokom endoskopije, dok na točno prepoznavanje distalnog kraja palisadnih krvnih žila utječe mogući ezofagitis, a sam kraj krvnih žila može često biti iregularan. Unatoč mogućim nedostacima, smatra se da je vrh želučanih nabora najbolji endoskopski pokazatelj GEJ-a.

BE nastaje procesom metaplazije, a zbog još nepoznatih razloga, metaplazija u BE predstavlja rizik za razvoj karcinoma. Postoje tri tipa želučanog (cilindričnog) epitela opisanog kod BE:

1. želučani-fundusni tip epitela koji sadržava stanice koje izlučuju mucin, parijetalne te glavne stanice
2. kardija tip epitela ("junctional"-tip) koji sadržava isključivo stanice koje izlučuju mucin
3. intestinalni tip epitela (specijalizirana intestinalna metaplazija) koji sadržava vrčaste stanice.<sup>8</sup>

Prva dva tipa epitela mogu biti morfološki potpuno ista kao i cilindrični želučani epitel stoga, ako se biopsijama dokažu fundusni ili kardija-tip epitela, može biti teško utvrditi jesu li ta dva epitela metaplastična zbog:

1. greške pri uzimanju biopsija kada je slučajno uzet uzorak želučane umjesto sluznice završnog jednjaka-pogotovo često kod sumnje na kratki BE
2. mogućnosti da završni dio jednjaka može imati kratke segmente želučanog epitela čak i u normalnim slučajevima.<sup>9</sup>



Ako se pak histološki potvrdi intestinalni tip epitela, postoji vrlo mala sumnja da je taj epitel metaplastičan i time patološki ako se nalazi u jednjaku te da predstavlja rizik za razvoj maligniteta. Stoga je prihvaćeno da je pronalazak intestinalne metaplazije u biopsijama distalnog dijela jednjaka uvjet “sine qua non” za dijagnozu BE. Noviji podaci ukazuju na to da i kardija-tip epitela predstavlja mogući rizik za razvoj karcinoma, ali konkretna veličina i procjena rizika nije jasna i zahtijeva brojna opsežna istraživanja kojima bi se postavile jasne smjernice postupanja sa bolesnicima kod kojih nije nađen intestinalni tip već samo kardija-tip epitela.

Ako se smatra da je BE bolest, a ne samo anatomska varijacija, tada on mora imati kliničke posljedice, a kao glavna je povišen rizik od razvoja adenokarcinoma jednjaka. Stoga se BE može definirati kao stanje kod kojeg je normalni pločasti epitel distalnog dijela jednjaka zamijenjen metaplastičnim cilindričnim epitelom bilo koje dužine i koji predstavlja rizik od razvoja adenokarcinoma jednjaka. S obzirom na to da je na osnovu dosadašnjih istraživanja dokazano da isključivo intestinalni tip epitela stvara povišen rizik za karcinom, dijagnoza BE se može postaviti samo ako je patohistološki utvrđen navedeni epitel.

### 1.1. EPIDEMIOLOGIJA

Incidencija BE je u porastu od 1970, paralelno sa povećanim brojem i endoskopskih pregleda, pa je nejasno da li je zaista riječ o povećanoj incidenciji BE ili lakšem postavljanju dijagnoze na osnovu novijih endoskopskih tehnika i općenito veće dostupnosti endoskopije. Srednja dob bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze je 50-55 godina, a iznimno rijetko se javlja prije 5. godine života. Muškarci, osobe bijele rase te Europljani imaju dvostruko veći rizik od nastanka BE. Većina podataka o prevalenciji te incidenciji bolesti je dobivena na osnovu studija koje su uključivale bolesnike podvrgnute gornjoj endoskopiji zbog određenih tegoba, a to su najčešće bili podaci iz bolničkih baza pa nije moguće izvesti jasne zaključke o prevalenciji u općoj populaciji, koja bi uključivala i asimptomatske bolesnike te one kojima endoskopija nije dostupna. Zbog toga su provedene i studije koje su prevalenciju bolesti izračunavale na osnovu patohistoloških podataka dobivenih obdukcijom pacijenata u općoj populaciji i time je ukupna prevalencija procijenjena na 0,4-6%.

### 1.1.1. SJEVERNA AMERIKA

Analiza iz 2001. godine je pokazala porast prevalencije sa 22,6 na 100000 osoba (1987) na 82,6 na 100000 osoba (1998), ali je taj porast pratila i 22 puta veća upotreba endoskopije u istom 10-godišnjem periodu te je zaključeno da je stvarna prevalencija ostala ista.<sup>10,11</sup> Studija koja je određivala prevalenciju BE kod pacijenata koji su bili podvrgnuti „screening“ kolonoskopiji i nakon toga im je ponuđena gastroskopija iako nisu imali tegobe od strane gornjeg GI trakta je utvrdila prisustvo BE u 16,7% tih pacijenata.<sup>12</sup>

### 1.1.2. JUŽNA AMERIKA

Podaci su poprilično oskudni. Kao najvažnija studija se navodi ona iz Brazila kod pacijenata starijih od 50 godina bez tipičnih GERB simptoma koja je utvrdila prevalenciju BE 7,75% u muškaraca te 3,8% u općoj populaciji.<sup>13</sup>

### 1.1.3. EUROPA

Velik je broj europskih studija, a većina podataka je dobivena od bolesnika koji su podvrgnuti endoskopiji, ali postoje i klasične populacijske studije iz Švedske i Italije. U nekoliko studija je primjećen porast prevalencije BE. Švedska populacijska studija je koncipirana na način da je slučajni uzorak 3000 ljudi iz opće populacije (21610) probran upitnikom o gastrointestinalnim simptomima, a potom je slučajan uzorak od 1000 ljudi endoskopiran. Prevalencija BE je bila 1,6%, a u 69% je to bio kratak segment Barrett-ovog jednjaka (engleski, short segment Barrett's esophagus-SSBE), kod bolesnika sa refleksnim tegobama prevalencija je bila 2,3%, a kod onih bez tegoba 1,2% uz alkohol i pušenje kao neovisne rizične faktore.<sup>14</sup> Slična je studija provedena u Italiji gdje je 1533 osoba iz opće populacije dva talijanska sela probrano upitnikom te im je potom urađena gornja endoskopija i utvrđena prevalencija 1,3%, od čega je 46,2% pacijenata sa utvrđenim BE bilo bez refleksnih simptoma.<sup>15</sup> Meta analiza u Ujedinjenom kraljevstvu je obuhvatila 10 studija i utvrdila srednju incidenciju od 1,17%, ali sa porastom od 0,08% između 1980. i 1996.godine. BE je otkriven u 12% osoba endoskopiranih zbog simptoma gastroezofagealne refleksne bolesti (GERB) te u 36% onih sa popratnim ezofagitisom.<sup>16</sup> Retrospektivna analiza u Španjolskoj je utvrdila porast incidencije BE za 6,9 puta od 1976. do 2001. te 9,3 puta veći porast SSBE od 1995. do 2000. Sveukupna incidencija od 1976. do 2001. je porasla od 0,73 na 9,73, a sveukupna prevalencija od 6,51 na 76,04. Istraživači su zaključili da porast incidencije ne

ovisi o broju endoskopija jer je broj endoskopija bio viši samo 1,9 puta.<sup>17</sup> Turska je zanimljiva zbog svoje lokacije na prijelazu Europe i Azije, ali nažalost postoji mali broj studija. Najpoznatija studija je utvrdila prevalenciju od 1,2% u populaciji 1000 pacijenata koji su podvrgnuti gornjoj endoskopiji.<sup>18</sup>

#### 1.1.4. AUSTRALIJA

U australskoj populaciji broj novootkrivenih BE je u znatnom porastu između 1990 do 2002 (2,9 naspram 18,9 na 1000 endoskopija), a porast se prati u dijagnostici SSBE-a, dok je za dugi segment Barrettovog jednjaka (engleski long segment Barrett's esophagus-LSBE) opisan pad od 17% (2,3 novih slučajeva u 1990, u odnosu na 1,9 u 2002 na 1000 endoskopija).<sup>19</sup>

#### 1.1.5. AZIJA

Općenito, u Aziji je prevalencija BE niža u odnosu na europske zemlje, ali su i podaci poprilično oskudni. Kineska studija je utvrdila prevalenciju BE od 2,44%, većina pacijenata su bili muškarci (68%), srednja dob pri postavljanju dijagnoze bila je 53 godine, a samo je 51% pacijenata imalo klasične simptome GERB-a.<sup>20</sup> Sveukupna prevalencija u Japanu na osnovu dvije prospektivne multicentrične studije je izračunata na 0,9-1,2%, a u Koreji 0,84%.<sup>21,22</sup>

#### 1.1.6. BLISKI ISTOK I AFRIKA

Izrazito su oskudni literaturni podaci, ali se pretpostavlja da je stopa prevalencije niža nego u zapadnim zemljama. Smatra se da je BE rijedak u zemljama subsaharske Afrike (Južnoafrička republika, Etiopije, Nigerija, Zimbabve, Kenija). Studija iz Egipta je utvrdila prisutnost BE od 7,3% kod 1000 pacijenata sa kroničnim refluksnim simptomima, dok je studija iz Saudijske Arabije utvrdila prevalenciju od 0,31% na preko 2500 pacijenata podvrgnutih endoskopiji iz bilo kojeg razloga.<sup>23,24</sup>

Zaključno, najveći broj studija o epidemiologiji BE dolazi iz Sjeverne Amerike i Europe. One upućuju na to da se porast postavljanja dijagnoze BE može dijelom objasniti porastom broja endoskopija, ali da postoje i podaci (pogotovo iz Europe) da je uistinu riječ o pravom porastu prevalencije bolesti.

Prevalencija GERB je puno niža u Aziji te Africi i na osnovu toga se zaključuje i da je prevalencija BE također niža u navedenoj populaciji. Uzrok su najvjerojatnije razlike u

prehrambenim navikama, nižoj incidenciji debljine, pušenja i konzumacija alkohola te incidencije HP infekcije koja je puno viša u Africi te Azijskim zemljama. Demografski rizični čimbenici pojave BE u istočnim i zapadnim zemljama su isti i uključuju muški spol, stariju životu dob te dugotrajnost GERB simptoma, stoga nije ni čudno da nerazvijene zemlje Afrike i Azije u kojima je očekivano trajanje života niže imaju i nižu incidenciju BE.

## 1.2. RIZIČNI ČIMBENICI ZA NASTANAK BARRETT-ovog JEDNJAKA

Kao najvažniji rizični čimbenik za razvoj BE navodi se GERB, iako samo 5-10% bolesnika sa GERB-om razvije BE, tako da se u podlozi sigurno nalazi velik broj vanjskih i unutranjih čimbenika rizika. Bolesnik sa GERB-om ima 5 puta veći rizik da u 5 godina razvije BE od bolesnika u općoj populaciji a još nema adekvatnih podataka da li i neerozivna refluksna bolest (NERB) predstavlja rizik razvoja BE. Bolesnici koji uz GERB imaju i BE subjektivno navode tek nešto češće refluksne tegobe nego bolesnici bez elemenata BE. Iako GERB uzrokuje BE, nejasno je da li dugotrajni refluks može predstavljati rizik za razvoj tumorskog žarišta u metaplastičnim stanicama. Poznato je da niski pH, ali također i žučne soli mogu dovesti do lomova DNA uzvojnice mehanizmom stvaranja slobodnih kisikovih radikala.<sup>25,26</sup> Debljina, a pogotovo abdominalni tip pretilosti praćen metaboličkim sindromom je poznati rizični čimbenik razvoja BE. BMI preko 30 kg/m<sup>2</sup> povećava rizik nastanka adenokarcinoma jednjaka za 4 puta, dok je rizik BE povećan tek 2 puta. Debljina djeluje direktno mehanički povišenjem intraabdominalnog tlaka i utjecajem na antirefluksnu barijeru, dok se u sklopu metaboličkog sindroma i intraabdominalnih nakupina masti luči velik broj proinflammatoryh citokina (TNF-a, IL-6, leptin, IGF-1, sniženo lučenje adiponektina) koji mogu sudjelovati u karcinogenezi.<sup>27</sup> Nitrozo spojevi, pogotovo NO (engleski nitrous oxide) iz hrane, putem stvaranja slobodnih kisikovih radikala mogu dovesti do oštećenja DNA, a njihov efekt se može prevenirati raznim antioksidansima u hrani (polifenoli iz crnog vina).<sup>28,29</sup> Patofiziološki, slina i hrana su izvori nitrozo spojeva koji se pretvaraju u nitrite djelovanjem bakterija u ustima. Nitriti su inertni u neutralnom pH, ali u kombinaciji sa kiselim pH stvaraju kisikove radikale. Hrana bogata vlaknima, voćem i povrćem ta vitaminom C i E bi mogla imati protektivni učinak zbog smanjenja razine slobodnih kisikovih radikala te koncentracije nitrozo spojeva. Smatra se da *Helicobacter pylori* (HP) nema većeg učinka u razvoju BE, dapače Cag A pozitivni sojevi HP bi mogli imati i protektivni efekt smanjujući produkciju kiseline. Zadnja istraživanja su pokazala statistički značajno snižen rizik od razvoja BE kod

bolesnika sa potvrđenom HP infekcijom<sup>30</sup>. Većina studija je pokazala dvostruko viši rizik od razvoja BE kod pušača, dok epidemiološke studije nisu potvrdile povišen rizik kod uzimanja alkohola.<sup>31,32</sup> Obiteljska predispozicija nastanka BE je potvrđena samo u sporadičnim serijama slučajeva. Smjernice različitih američkih i britanskih gastroenteroloških društava se razlikuju ovisno o tome koje bolesnike treba podvrgnuti „screening“ endoskopiji radi otkrivanja BE. Po ASGE (American Society of Gastrointestinal Endoscopy) „screening“ endoskopiji treba podvrgnuti bolesnike sa kroničnim GERB-om, dok po BSG (British Society of Gastroenterology) samo bolesnike sa alarmantnim simptomima. Zadnje AGA (American Gastroenterology Association) smjernice iz 2015. godine sugeriraju da nema potrebe za rutinskim „screening-om“ bolesnika sa GERB-om, već samo kod onih sa dodatnim rizičnim čimbenicima za razvoj BE: stariji od 50 godina, muškarci, bijelci, prisustvo hijatalne hernije te povišen BMI uz abdominalnu pretilost.

### 1.3. PATOGENEZA I PATOFIZIOLOGIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA

Proces razvoja BE najvjerojatnije slijedi dva odvojena koraka. Prvi korak predstavlja transformaciju normalnog višeslojnog pločastog epitela jednjaka u jednostavni cilindrični kardija-tip epitela. Navedeno se događa kao odgovor na kroničnu ozljedu zbog trajnog refleksa i djelovanja želučanog sadržaja na višeslojni pločasti epitel. Transformacija višeslojnog pločastog epitela u kardija-tip epitela se najvjerojatnije događa relativno brzo, unutar par godina. Drugi korak predstavlja razvoj vrčastih stanica tipičnih za intestinalnu metaplaziju i taj proces je nešto duži te vjerojatno traje oko 5-10 godina.<sup>33</sup> Kada nastane, BE razvija svoju transformaciju u niski te visoki stupanj displazije prema adenokarcinomu pa se cijeli proces najčešće opisuje kao Barrett metaplazija-displazija-adenokarcinom slijed.

Prvi opis normalnog gastroezofagealnog spoja je dao Hayward koji je naznačio da u normalnim uvjetima postoji “junctional” ili “buffer” zona cilindrične sluznice između normalne želučane sluznice koja luči kiselinu te višeslojnog pločastog epitela jednjaka.<sup>34</sup> Ova “buffer” zona se, po Hayward-u, normalno nalazi do 2 cm iznad GEJ, a ima slijedeće karakteristike:

1. histološki je jasno razgraničena od fundusnog i piloričnog epitela želuca
2. ne secernira kiselinu niti pepsin, već je rezistentna na oboje

3. nije kongenitalna već stečena
4. varira u dužini i progresivno se povećava u visinu prateći GERB
5. potencijalno je reverzibilna korekcijom GERB-a

Po današnjim stavovima (iako još postoje nesuglasice oko histologije normalnog GEJ), smatra se da u normalnim uvjetima ne postoji kardija-tip sluznice u GEJ-u, ili ako postoji može obuhvaćati maksimalno 4 mm distalnog jednjaka iznad GEJ-a,<sup>35</sup> dok je nalaz dužeg epitela stečen u sklopu kroničnog GERB-a.<sup>36</sup> Ta saznanja su proizašla iz endoskopija bolesnika kojima je urađena ezofagektomija uz intratorakalnu ezofagogastro anastomozu zbog hijatalne hernije (dakle uz gubitak donjeg gastroezofagealnog sfinktera-DES). Postoperativna endoskopija uz biopsije dokazuje da velik broj tih bolesnika razvija cilindrični epitel u ostatnom jednjaku koji je isti kao i kardija-tip epitela, a da se dužina epitela povećava proporcionalno vremenu nakon operacije.<sup>37,38</sup> Dodatna potvrda tvrdnji da je kardija-tip epitela stečen proizlazi iz činjenice da se ne može pronaći nigdje drugdje u GI traktu, a kada je prisutan na GEJ-u, uvijek je praćen elementima upale neovisno o HP infekciji ili drugoj patologiji želuca.<sup>39</sup> Prisustvo kardija-tip epitela korelira s objektivnim pokazateljima GERB-a, kao što su inkompetentnost DES-a, patološka izloženost kiselinu na 24-h pH monitoringu, hijatalna hernija te erozivni ezofagitis. Također, postoje dokazi da je mikroskopska prisutnost kardija-tip epitela ustvari najraniji znak GERB-a, čak i kod asimptomatskih bolesnika. Patofiziološki, refluksna bolest započinje distenzijom želuca nakon obilnog obroka koja dovodi do prolaznog popuštanja DES-a i slobodnog izlaganja distalnog jednjaka kiselinu.<sup>40</sup> Nitriti koji se nalaze u slini u kontaktu sa želučanom kiselinom pretvaraju se u dušikov oksid<sup>41</sup> koji djeluje potencijalno mutageno na razini DES-a. Prolazno popuštanje sfinktera sa progresijom i ponavljanjem distenzije želuca dovodi do trajnog gubitka funkcije DES-a, što dovodi do slobodnog refluksa kiseline, povećanja dužine kardija-tip epitela u jednjaku te pomaka granice cilindričnog i višeslojnog pločastog epitela oralnije.<sup>42</sup> U submukozi regije gdje se nalazi novonastali kardija-tip epitela i dalje se mogu dokazati tipiče žlijezde jednjaka, što je dodatan znak da je kardija tip epitela stečen i razvija se na mjestu prethodnog višeslojnog pločastog epitela. Molekularni mehanizam navedene transformacije je i dalje nerazjašnjen, ali je dokazano da izlaganje višeslojnog pločastog epitela jednjaka kiselinu dovodi do širenja intercelularnih prostora koji omogućava molekulama veličine do 20kDa prodiranje do matičnih stanica bazalnog sloja jednjaka,<sup>43</sup> a navedena interakcija rezultira fenotipskom transformacijom u smislu produciranja kardija cilindričnog, a ne višeslojnog

pločastog epitela. Kardija tip epitela se smatra nestabilnim epitelom koji se može razviti, ovisno o okolišnim i genetskim čimbenicima, u dva smjera:

1. ekspresija želučanih gena koji dovode do formiranja parijetalnih stanica unutar submukoznih žlijezda i koji rezultiraju pojavom oksintokardijalne mukoze koja nije premalignog tipa te koja ne progredira prema intestinalnoj metaplaziji. Stoga se ovaj razvojni put smatra povoljnim tj regresivnim.
2. ekspresija intestinalnih gena dovodi do pojave vrčastih stanica - intestinalne metaplazije koja predstavlja nepovoljni razvojni put, odnosno progresivni put s obzirom na to da je taj tip epitela premaligni.<sup>44</sup>

Još nije poznato koji su specifični stanični mehanizmi potrebni za nastanak gore navedenih promjena. Smatra se da prvi korak, pretvorba pločastog u kardija tip epitela, nastaje kao posljedica refluksa kiselog želučanog sadržaja, dok drugi korak, pojava intestinalne metaplazije, kao posljedica različitih intraluminalnih etioloških čimbenika. Kao najvažniji navodi se, uz želučanu kiselinu, i refluks žučnih soli.<sup>45,46</sup> Iako točan mehanizam djelovanja na epitel nije poznat, smatra se da su, isključivo pri pH 3-6, žučne soli otopljene i neionizirane te se mogu akumulirati u stanicama mukoze i uzrokovati njihovo direktno oštećenje.<sup>47</sup> Unutar stanice pH je 7 što dovodi do ioniziranja žučnih soli koje u takvom stanju mogu uzrokovati direktno oštećenje mitohondrija, staničnu toksičnost te djelovati mutageno.<sup>48,49</sup>

Prisustvo vrčastih stanica je "condicio sine qua non" za postavljanje dijagnoze BE. Mogućnost otkrivanja intestinalne metaplazije korelira sa dužinom sluznice BE. Ako je dužina sluznice BE preko 4 cm, smatra se da će se skoro kod svih pacijenata patohistološki dokazati intestinalna metaplazija.<sup>50,51</sup> Međutim, lokacija vrčastih stanica nije pravilna pa se nikad ne može potvrditi intestinalna metaplazija u cijelom segmentu sluznice BE. Vrčaste stanice su najgušće raspoređene oko same granice epitela želuca i jednjaka (skvamokolumnarna granica - granica višeslojnog pločastog epitela sa cilindričnim epitelom), dok u ostalim dijelovima sluznice BE njihov raspored i gustoća variraju. Sama dužina sluznice BE je definirana endoskopski izmjerenom dužinom, a ne dužinom sluznice u kojoj smo dokazali intestinalnu metaplaziju. Npr, ako je endoskopska dužina sluznice BE 5 cm, a intestinalna metaplazija je pronađena samo u jednom cm oko skvamokolumnarne granice i dalje se smatra da je riječ o dugačkom BE, dakle njegova M vrijednost je 5. Međutim kliničko ponašanje i rizik od razvoja adenokarcinoma je puno veći ako je duž cijelog segmenta sluznice BE (u gornjem primjeru 5 cm) patohistološki dokazana i intestinalna metaplazija.

Kardija tip epitela se razvija brzo, tokom 1-2 godine, dok za razvoj vrčastih stanica i intestinalne metaplazije u prosjeku treba još dodatnih 5-10 godina.<sup>52</sup> Molekularni mehanizmi pojave vrčastih stanica još nisu poznati, ali postoji velik broj dokaza da najvažniju ulogu ima pojačana ekspresija "homeobox" gena Cdx-2 koja se može dokazati od faze pločastog epitela prema upali i kardija-tip epitelu, dok je najveća u fazi intestinalne metaplazije.<sup>53</sup> U ekspresiji Cdx-2 najveću ulogu ima intraluminalna pH vrijednost.<sup>54</sup> Ekspresija brojnih citokina ovisi o stupnju upalnog odgovora i direktno je odgovorna za pojavu intestinalne metaplazije, a i genetska predispozicija (polimorfizam antagonista receptora Il-1 te Il-10)<sup>55</sup> daje osnovu jačeg upalnog odgovora na refluks i time veći rizik razvoja BE.

Sluznica BE je premalignog tipa, ima pojačanu proliferaciju, smanjenu apoptozu te povećani udio diploidnih i aneuploidnih stanica u odnosu na normalni epitel.<sup>56</sup> Navedene karakteristike omogućuju nakupljanje genetskih abnormalnosti te razvoj displazije i maligne transformacije.<sup>57</sup> Displastične stanice su karakterizirane citološkim i strukturnim abnormalnostima kao što je gubitak nuklearne polarnosti te pojava nepravilnosti i distorzije žlijezda.<sup>58</sup> Tipična patohistološka podjela uključuje 4 kategorije: a) bez displazije; b) neodređeno za displaziju; c) displazija niskog stupnja te d) displazija visokog stupnja. Klasifikacija displazije ima izrazito veliki klinički utjecaj na procjenu rizika razvoja karcinoma te, do danas, predstavlja najvažniji prediktivni čimbenik pojave invazivnog adenokarcinoma. Međutim klasifikacija displazije, pogotovo izvan specijaliziranih kliničkih centara, je i dalje podložna velikom subjektivnom čimbeniku. Nedostatak preciznosti u patohistološkoj klasifikaciji displazije je doveo do potrebe prepoznavanja i upotrebe objektivnijih molekularnih i biokemijskih pokazatelja povišenog rizika od progresije prema adenokarcinomu jednjaka.

#### 1.4. BIOLOGIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA

BE se razvija u sklopu metaplazije, procesa kod kojeg dolazi do zamjene jedne vrste adultnih stanica drugima. Smatra se da metaplazija nastaje kao obrana od kroničnog upalnog procesa koji je u jednjaku uzrokovam GERB-om. Metaplazija u sklopu BE može nastati na dva načina:



1. direktna potpuna promjena cijelog višeslojnog pločastog epitela u intestinalni tip epitela (transdiferencijacija)

2. promjena diferencijacijskog obrasca bazalnih (matičnih) stanica jednjaka.<sup>59</sup>

Kod prvog mehanizma dolazi do direktne zamjene jedne vrste potpuno diferenciranih stanica u drugu vrstu, a javlja se između fenotipa stanica koje su bile prisutne u jednjaku tokom embrionalnog razvoja.<sup>59</sup> Naime, tokom embriogeneze, jednjak je početno obložen vrčastim (goblet cells) i cilindričnim epitelom koji se tokom sazrijevanja pretvara u pločasti epitel<sup>60,61</sup> i to neovisno o staničnoj proliferaciji ili apoptozi. Po ovoj teoriji, razvoj BE kasnije tokom života je samo okretanje ovog procesa. Međutim jednom kada se formira Barrett-ova metaplazija, navedeni epitel mora biti “održavan i samo-obnavljan”, a to je proces kojeg objašnjavamo drugim gore navedenim mehanizmom. Naime, matične stanice su odgovorne za proliferaciju, obnavljanje i razvoj različitih tipova stanica te njihovu regeneraciju nakon ozljede.<sup>62</sup> Matične stanice bi mogle biti odgovorne za održavanje sluznice BE te njegovu sklonost malignoj transformaciji. Naime, tokom razvoja, matične stanice koje su p63 pozitivne odgovorne su za razvoj cilindričnog epitela; kada dođe do zamjene cilindričnog epitela pločastim, u bazalnom sloju i dalje perzistiraju navedene p63 pozitivne stanice, dok su stanice u površnom pločastom epitelu p63 negativne. Dokazano je da u sluznici BE nema pozitivnog imunohistokemijskog bojanja na p63, što bi značilo da se Barrett-ove matične stanice razlikuju od onih za vrijeme embrionalnog razvoja.<sup>63</sup> Smatra se da na sve gore fenotipske promjene najviše utječe “okolina” u smislu upale i refluksom oštećenog jednjaka koja djeluje putem promjene ekspresije par najvažniji gena koji reguliraju stanični fenotip. Najvažniji ciljni geni u tom smislu bi bili transkripcijski faktori Cdx1, Cdx2 i SOX9.<sup>64</sup> Cdx1 i Cdx2 su “homeobox” geni koji su odgovorni za diferencijaciju intestinalnog epitela i razvoj cilindričnih stanica.<sup>65</sup> mRNA ekspresija Cdx1 i Cdx2 nije prisutna u normalnom pločastom epitelu ili GERB-u bez elemenata BE, već samo u BE bez i sa displazijom te u adenokarcinomu jednjaka.<sup>66</sup> SOX9 ima ulogu u formiranju vrčastih stanica,<sup>67</sup> a njegova ekspresija također prati gore navedenu kod CDX gena. Barrett-ova metaplazija je posljedica kroničnog GERB-a pa se smatra da refluksni želučani sadržaj i posljedična upala mogu inducirati transkripcijske čimbenike te aktivirati signalne puteve koji u konačnici dovode do razvoja intestinalnog epitela. U ljudi je dokazano da izlaganje kiselinu i žučnim solima te upala inducirana GERB-om dovodi do pojačane ekspresije CDX2 i time ekspresije intestinalnih gena (vilin, sukraza-izomaltaza i MUC2).<sup>68,69</sup> Moguća hipoteza nastanka BE je i

aktivacija signalnih puteva koji inače sudjeluju u održavanju i razvoju normalnog tankog crijeva kao što su Wnt i Notch te Hedgehog i Bone Morphogenetic Protein (Bmp) 4. Wnt i Notch inače sudjeluju u održavanju progenitornih stanica intestinalnih kripti. Izlaganje žučnim solima te prekomjerna ekspresija CDX2 dovodi do “down-regulacije” Notch signalnog puta, što dovodi do pojačane ekspresije vrčastih stanica.<sup>68</sup> Pojačana ekspresija Bmp4 je dokazana u epitelu jednjaka zahvaćenog upalom, a direktno izlaganje stanica pločastog epitela BMP-u 4 dovodi do pojačane ekspresije SOX9 te citokeratina karakterističnih za kolumnarni epitel.<sup>70</sup>

## 1.5. PRIRODNI TIJEK BARRETT-ovog JEDNJAKA I ČIMBENICI PROGRESIJE BOLESTI

Uzevši u obzir relativno nizak stupanj progresije BE prema adenokarcinomu, pogotovo kod bolesnika bez displazije epitela, pitanje je koje je adekvatno praćenje bolesnika.<sup>71</sup> I dalje se smatra da je stupanj displazije epitela najvažniji čimbenik u procjeni rizika od progresije BE, a da je preskupo i nepotrebno učestalo endoskopsko praćenje svih bolesnika sa BE.<sup>72</sup> Dok su ranije studije preuveličavale rizik od razvoja adenokarcinoma,<sup>73</sup> studija Shaheen i suradnika<sup>71</sup> je procijenila ukupni rizik nastanka adenokarcinoma na 0,5% po pacijentu po jednoj godini praćenja. Dvije su metaanalize<sup>74,75</sup> potvrdile navedenu procjenu, a sve to nas upućuje na potrebu pronalaženja odgovarajućeg alata za stratifikaciju rizika, koji bi omogućio prepoznavanje ugroženih bolesnika u samom početku bolesti koji bi zatim zahtijevali intenzivnije endoskopsko praćenje. Tako bi samo praćenje bolesnika bilo zaista racionalno, odnosno “cost-effective”. Zato su istraživani brojni klinički, endoskopski i genetski markeri koji bi mogli nadopuniti ili zamijeniti displaziju epitela, do sada jedinog dokazanog čimbenika progresije BE.

### 1.5.1. ČIMBENICI RIZIKA OD STRANE PACIJENTA

a) DOB: podaci su oskudni. Po studiji Cleveland-ske klinike,<sup>76</sup> dob je rizični čimbenik od razvoja displazija/adenokarcinoma, dok po novijim studijama<sup>77,78</sup> stupanj displazije i razvoj adenokarcinoma se nije razlikovao kod bolesnika mlađih ili starijih od 50 godina. Zaključno, trenutno nema dovoljno podataka kojima bismo dob bolesnika proglasili rizičnim čimbenikom progresije BE.

b) SPOL: dobro je poznato da muškarci više oboljevaju od adenokarcinoma jednjaka ali utjecaj spola na progresiju BE prema višem stupnju displazije ili karcinoma nije toliko jasan. Veći broj studija (meta analiza te “case-control” studija)<sup>79,80</sup> ipak ukazuje da je incidencija adenokarcinoma kod BE dvostruko veća u muškaraca (1,01 na 100 pacijenata godišnje) nego u žena (0,45 na 100 bolesnika godišnje) tako da se smatra da je muški spol rizični faktor progresije stupnja displazije i razvoja adenokarcinoma kod pacijenata sa BE.

c) INDEKS TJELESNE MASE (Body mass index-BMI) I VISCERALNA PRETILOST: smatra se da primarno abdominalno masno tkivo (koje je metabolički aktivno u produkciji inflamatornih citokina i kemokina) može imati utjecaj na progresiju BE. Postoji dokazana veza između BMI-a i visceralne pretilosti kao rizičnog čimbenika od adenokarcinoma jednjaka.<sup>81</sup> Međutim, podaci koji bi ukazivali na rizik od progresije u sklopu BE su oprečni. Jedna “case-control” studija je pronašla pozitivnu korelaciju<sup>80</sup> dok druge studije istu nisu potvrdile.<sup>82</sup> Međutim, jasno je dokazana veza između “waist-hip” omjera te prevalencije displazije niskog stupnja (“low grade dysplasia”-LGD) i displazije visokog stupnja (“high grade dysplasia”-HGD).<sup>83</sup> Abdominalna pretilost je puno češća u muškaraca, što se može dovesti u vezu sa većim rizikom oboljevanja od adenokarcinoma jednjaka u muškaraca, ali iako postoji vrlo vjerojatna biološka povezanost, čvrsti dokazi za uzročno-posljedičnu vezu adenokarcinoma i abdominalne pretilosti još nedostaju.

d) PUŠENJE: za razliku od planocelularnog karcinoma, povezanost pušenja i adenokarcinoma jednjaka je puno manja. Rotterdamska grupa<sup>84</sup> je dokazala da je rizik od adenokarcinoma jednjaka 2,3x veći kod pušača nego ne-pušača, dok ostale studije to nisu potvrdile<sup>85</sup> tako da nema čvrstih dokaza o povezanosti pušenja s progresijom prema karcinomu u sklopu BE .

e) NAČIN PREHRANE I NUTRITIVNI DODACI: nekoliko “case-control” studija<sup>86,87</sup> dokazalo je vezu povišenog rizika od nastanka adenokarcinoma jednjaka uz prehranu sa puno masnoća i smanjenim unosom voća i povrća. Također, na osnovu upitnika kojeg su pacijenti sami ispunjavali, dokazan je smanjeni rizik od razvoja adenokarcinoma kod pacijenata koji su koristili multivitamine, vitamin C I E te pripravke selena.<sup>88</sup> Smatra se da način prehrane direktno ili indirektno (putem debljine) utječe na razvoj adenokarcinoma, ali je pozitivna prediktivna vrijednost slaba zbog nemogućnosti detaljnije procjene realnog unosa određenih namirnica.

f) SUPRESIJA KISELINE (FARMAKOLOŠKA ILI KIRURŠKA), ASPIRIN, NSAID: iako je dokazano da je kronični GERB najvažniji rizični čimbenik u razvoju adenokarcinoma, supresija kiseline se nije pokazala kao izrazito efikasna u smanjenju rizika od neoplastične progresije. Zna se da inhibitori protonske pumpe (IPP) smanjuju abnormalnosti staničnog ciklusa kod BE,<sup>89</sup> ali biološki učinak navedenog je dosta varijabilan. Trajna supresija kiseline smanjuje neoplastičnu proliferaciju<sup>90</sup> ali dovodi do porasta vrijednosti gastrina koji je proliferativni čimbenik za BE.<sup>91</sup> Jedna studija<sup>92</sup> je dokazala povezanost kasnog početka IPP terapije i povišene sklonosti razvoja displazije i adenokarcinoma u sklopu BE, dok druge epidemiološke studije,<sup>93</sup> RCT,<sup>94</sup> i meta analize<sup>95</sup> nisu dokazale navedenu vezu. Dugotrajno praćenje bolesnika u LOTUS studiji<sup>96</sup> bi moglo dati odgovor na učinak kirurške vs farmakološke supresije kiseline u ishodu i progresiji BE. Važan čimbenik bi moglo biti vrijeme početka IPP terapije, jer je dokazano da supresija kiseline smanjuje oksidativno oštećenje u pacijenata koji su p53 negativni. Ako histološka analiza biopsijom dobivenih uzoraka sluznice distalnog jednjaka ukaže na formiranje nestabilnosti genoma (p53 pozitivan), tada supresija kiseline neće imati veliki utjecaj na progresiju bolesti.<sup>97</sup> Epidemiološke studije potvrđuju povezanost uzimanja aspirina/NSAID sa smanjenim rizikom od razvoja adenokarcinoma<sup>98,99</sup> tako da na osnovu trenutnih dokaza postoji uloga aspirina i NSAID u prevenciji progresije BE prema adenokarcinomu.

#### 1.5.2. ENDOSKOPSKI ČIMBENICI RIZIKA

a) DUŽINA BE: dvije retrospektivne studije<sup>84,85</sup> su povrdile vezu između dužine BE te razvoja HGD i adenokarcinoma, ali su bili uključeni pacijenti sa već poznatom displazijom visokog stupnja. Prospektivne studije<sup>100,101</sup> su dokazale vezu između dužine BE i progresije prema bilo kojem stupnju displazije i adenokarcinomu. Međutim, nekoliko drugih studija i metaanaliza<sup>75,78</sup> nije potvrdilo zaključke prethodno navedenih retrospektivnih i prospektivnih studija. Zaključno, iako ima dosta pokazatelja i dokaza da je dužina BE rizični čimbenik u razvoju HGD-a, nužne su veće studije koje bi u obzir uzele i bolesnike bez inicijalno dokazane displazije. “Cut-off” vrijednosti dužine BE koja bi se smatrala rizičnom nije poznata.

b) NODULARNOST: prisustvo nodularnosti ili endoskopski vidljivih lezija u bolesnika sa HGD-om je rizični čimbenik progresije prema adenokarcinomu. Jedna retrospektivna studija<sup>102</sup> je dokazala povišen rizik od razvoja adenokarcinoma za 2,5 puta u bolesnika koji su imali mukoznu leziju (elevaciju) čak i do 1 cm promjera. Bolesnici s ulkusom i HGD-om

imaju veću prevalenciju invazivnog adenokarcinoma (80%) naspram bolesnika bez ulceracije (52%).<sup>103</sup> Zaključno, prisustvo vidljivih lezija je mogući pokazatelj agresivne naravi sluznice BE i zahtijeva češće kontrole i raniju terapiju, no premda utječu na progresiju bolesti, jedini etablirani primarni marker početnog (intramukoznog) karcinoma jednjaka je HGD.

c) DUŽINA HIJATALNE HERNIJE: dužina hijatalne hernije preko 6 cm je bila prediktivni pokazatelj progresije prema HGD/adenokarcinomu u velikoj kohortnoj studiji.<sup>101</sup> Objašnjenje leži u tome da dužina hijatalne hernije korelira sa težinom gastroezofagealnog refluksa (veća izloženost kiseline zbog toga što hernija djeluje kao dodatni rezervoar kiseline i “puni” jednjak

### 1.5.3. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA-ČIMBENICI RIZIKA

a) STUPANJ DISPLAZIJE: stupanj displazije je najvažniji čimbenik procjene rizika bolesnika sa BE. Trenutna stratifikacija se zasniva na progresiji BE bez displazije prema LGD-u zatim HGD-u te adenokarcinomu jednjaka.<sup>104</sup> Adekvatna patohistološka dijagnoza ovisi i o pravilno uzetim biopsijama po Seattle protokolu. Prema tom protokolu, kada nema prethodnih podataka o displaziji, biopsije uzoraka Barrett-ove sluznice treba uzimati na svaka 2 cm iz 4 kvadranta, a dobiveni uzorci se stavljaju u odvojene bočice s formalinom. Ako je bolesnik već imao dokazanu LGD ili HGD, biopsijski uzorci se uzimaju na svaki 1 cm u 4 kvadranta. Međutim i dalje postoje nedoumice o tome da li LGD predstavlja veći rizik od razvoja adenokarcinoma od ne-displastičnog BE. Kod nedisplastičnog BE progresija prema adenokarcinomu je 5,98/1000 bolesnika godišnje, kumulativno 0-5%. Rizik od prelaska LGD-a u adenokarcinom se razlikuje u brojnim studijama; od 16,98/1000 bolesnika godišnje<sup>74</sup> do 2,3/1000 bolesnika godišnje.<sup>105</sup> Procijenjeni ukupni rizik od progresije prema adenokarcinomu kod LGD je 0,6-1,2% godišnje. Međutim postoji velika inter-opservacijska varijabilnost. Dokazano je da kada veći broj patologa, više od 2, potvrdi dijagnozu LGD-a, kumulativno napredovanje prema adenokarcinomu je češće, 41% naspram 28%, a kada tri patologa potvrde dijagnozu, kumulativni rizik je 80%.<sup>106</sup> Iako postoji puno više dokaza za stupanj progresije HGD-a prema adenokarcinomu, i tu se podaci razlikuju, od 16% tokom 7 godina<sup>107</sup> do 50% tokom 5 godina.<sup>108</sup> Smatra se da je najvažniji uzrok tome također inter-opservacijska varijabilnost ali i greške prilikom uzimanja biopsija. Zaključno, stupanj displazije nije savršen, ali se do danas najčešće rabi i najprihvaćeniji je marker stratifikacije rizika bolesnika sa BE.

b) EKSTENZIJA DISPLAZIJE: patološki ekstenzija displazije se dijeli na fokalnu (kada je HGD dokazana u manje od 5 kriпти u jednom bioptičkom uzorku) te difuznu (više od 5 kriпти u jednom uzorku). Po jednoj studiji<sup>102</sup> izračunat je stupanj progresije prema adenokarcinomu jednaka od 14% tokom 3 godine kod fokalne te 56% kod difuzne displazije. Slično je potvrđeno i kod LGD.<sup>109</sup> Iako se smatra da je navedeni parametar mogući prediktor razvoja adenokarcinoma, glavni ograničavajući čimbenik je kompleksna i zahtjevna patohistološka tehnika.

#### 1.5.4. BIOMARKERI

Upotreba biomarkera i traganje za novim biljezima je izuzetno važno jer niti jedan od poznatih kliničkih ili endoskopskih kriterija nema dovoljno jaku prediktivnu vrijednost za prepoznavanje bolesnika koji imaju povišeni rizik od progresije BE prema adenokarcinomu. Razvoj biomarkera i njihovo daljnje istraživanje je vrlo atraktivno područje, ali postoje i brojni nedostaci: prepoznavanje klinički korisnih biomarkera koji se već koriste u istaživanju karcinoma, greške zbog neočekivanih događaja poput analize uzoraka masenim spektrofotometrom ali na različite dane, utjecaj pohrane i postupanja sa samim uzorkom na ekspresiju biomarkera, smanjena mogućnost reproducibilnosti između laboratorija te manjak prospektivnih kontroliranih studija zbog visokih troškova i problema sa veličinom uzoraka.<sup>110</sup> Ipak, molekularni biomarkeri imaju sposobnost smanjenja inter-opservacijskih različitosti koje su tipične pri očitavanju displazije te omogućuju puno lakšu procjenu rizika i vrijeme za intervenciju.<sup>111,112</sup> U nastavku je prikazan pregled do sada upotrebljivanih i istraživanih biomarkera kod BE.

a) DNA abnormalnosti (aneuploidija/tetraploidija): aneuploidija (abnormalni broj kromosoma) i tetraploidija (broj kromosoma u stanici dvostruko veći nego u normalnim stanicama) se odnose na brojčane i strukturne promjene kromosoma koja dovode do patološkog DNA sadržaja i najčešće su istraživani biomarkeri kod BE. Najveća studija<sup>111</sup> dokazala je da su navedene DNA abnormalnosti izrazito korisne u procjeni rizika kod nedisplastičnog BE te LGD sa 5-godišnjim kumulativnim rizikom od razvoja karcinoma koji je 28% naspram 0% u onih kod kojih nije dokazana aneuploidija ili tetraploidija. Sama tetraploidija (4N) dovodi do relativnog rizika od razvoja karcinoma do 7,5% naspram onih koji nemaju tetraploidiju<sup>112</sup> Najveća zapreka širokoj upotrebi DNA abnormalnosti je tehnički problem u sklopu izvođenja protočne citometrije ali se to nastoji nadvladati laserskom

citometrijom koja mjeri aneuploidiju na osnovu staničnog bojanja i to na tkivu u parafinskim kockama koje je fiksirano u formalinu.<sup>113</sup>

b) ABNORMALNOSTI TUMOR SUPRESORSKOG GENA: gubitak heterozigotnosti (LOH-gubitak funkcije drugog alela gena kada je jedan od alela već inaktiviran) za tumor supresor gen p53 je jedan od najvažnijih čimbenika progresije BE.<sup>114</sup> Relativan rizik od progresije prema adenokarcinomu u pacijenata sa p53-LOH iznosi 16, dok su osjetljivost i specifičnost imunohistokemije (dokaz prekomjerne ekspresije p53), za detekciju progresije prema HGD-u i adenokarcinomu kod LGD-a 88-100% odnosno 75-93%,<sup>115</sup> ali je osjetljivost samo 32% kod nedisplastičnog BE.<sup>116</sup> Stoga su p53 LOH te imunohistokemijski dokaz p53 ekspresije najvažniji kandidati za rutinsko testiranje kod BE u velikim, multicentričnim studijama. Ipak, smatra se da je p53 LOH puno osjetljivi pokazatelj od imunohistokemijske metode, jer se pojavljuju novi dokazi koji upućuju na to da imunohistokemija ne mora korelirati sa stupnjem displazije te progresije prema adenokarcinomu. APC (adenomatous polyposis coli) gen, koji inače regulira Wnt signalni put, je također mutiran kod BE bilo metilacijom,<sup>117</sup> bilo LOH,<sup>118</sup> ali su nužne veće studije za detaljnju potvrdu koristi u kliničkoj praksi.

c) EPIGENETSKE PROMJENE: epigenetske promjene se odnose na post-transkripcijsko utišavanje određenih gena mehanizmima kao što su metilacija ili acetilacija. Najčešća genetska abnormalnost je metilacijom inducirana inaktivacija p16 tumor supresorskog gena. Kod bolesnika sa BE, metilacija p16 ima visoku prevalenciju (34-66%),<sup>119</sup> ali je njezina prediktivna vrijednost manja nego aneuploidije i LOH p53. Opisana je i hipermetilacija gena APC, RUNX3 i TIMP1 kod BE ali njihova uloga još nije do kraja razjašnjena.

d) REGULATORI STANIČNOG CIKLUSA: proteini regulatori staničnog ciklusa (npr ciklini) su potencijalno korisni biomarkeri jer su modulirani metilacijom p16, koja je dokazana kao važna patologija kod BE. Ciklin D1 je antagonist p16 i zajedno vrše regulaciju staničnog ciklusa. Bolesnici koji su pozitivni na ciklin D1 imaju 6-7 puta veći rizik od razvoja adenokarcinoma.<sup>120</sup> S obzirom da postoje i studije kod kojih nije nađena pozitivna korelacija,<sup>121</sup> upotreba ciklina se još ne može preporučiti kao rutinska metoda u praćenju progresije bolesnika sa BE.

e) POREMEĆAJI PROLIFERACIJE: i dalje postoje kontroverze o tome da li povećana proliferacija stanica prati teži stupanj displazije.<sup>121</sup> Od čimbenika proliferacije najbolje je

istražena ekspresija Mcm2 kojom je dokazana proliferacija u 28,4% stanica kod bolesnika sa progresijom prema adenokarcinomu u odnosu na one bez displazije ili LGD-a gdje je proliferacije bila izražena u 3,4% stanica.<sup>122</sup> Istraživane su i frakcije staničnih ciklusa S i G2 kada je praćenjem od 6 godina dokazano da je rizik od adenokarcinoma ipak nešto povećan.<sup>123</sup> Za ove markere nužne su opsežnije studije. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) i Ki67 se nisu pokazali kao biomarkeri koji bi bili korisni u praćenju bolesnika, naime porast Ki67 je opisan i kod displazije ali i GERB-a, dok su rezultati za PCNA poprilično raznoliki.

Samo taksativno su ovdje navedeni drugi biomarkeri koji su ispitivani u početnim, manjim studijama i koji zahtijevaju opsežnija istraživanja te fazu 3 i 4 kliničkih studija: Her2/Neu,<sup>124</sup> cMYC,<sup>125</sup> COX-2,<sup>126</sup> EGFR.<sup>127</sup>

“Fluorescence in-situ hybridization” (FISH) je tehnika koja omogućuje detekciju sadržaja DNA i koja locira nepravilnosti u stanicama upotrebom fluorescentno označenih DNA proba. Iako je njezina glavna korist dokazana u organima poput mokraćnog mjehura, pluća, žučnih vodova, u novije vrijeme upotrebljava se i kod BE u detekciji genetskih nepravilnosti.<sup>128</sup> FISH može prepoznati različite oblike citogenetskih promjena kao što su aneusomija (abnormalnost broja kromosomskih kopija), duplikacije, amplifikacije, delecije i translokacije na tumor supresorskim genima (9p21, 17p13.1) i protoonkogenima (8q24.2 i 17q11.2). FISH se najčešće provodi na citološkim uzorcima, što može biti i prednost, jer citologija predstavlja cijelu dužinu BE, dok patohistološki uzorci samo manji dio sluznice koji je uzet bioptičkim kliještima. U novije vrijeme upotrebljava se “multicolored FISH four probe set” za detekciju displazije kod BE sa mogućnošću prepoznavanja HGD-a i adenokarcinoma u visokom postoku osjetljivosti (84-93%) te specifičnosti (93%),<sup>129</sup> a prisustvo polisomije (dva ili više protoonkogeni) je najvažniji prediktivni čimbenik razvoja HGD-a i adenokarcinoma.

Vrlo je moguće da će adekvatan mehanizam za praćenje bolesnika biti kombinacija (panel) biomarkera zajedno sa okolišnim čimbenicima te demografskim karakteristikama. Kombinacija aneuploidije, 17p LOH i 9pLOH u 79% dovodi do rizika od razvoja adenokarcinoma, a u bolesnika kod kojih su sva tri markera negativna u 12% tokom 10 godina. Ipak, na osnovu do sada provedenih istraživanja, smatra se da je inaktivacija p16 (putem LOH-a ili metilacijom) jedan od najranijih čimbenika u razvoju karcinogeneze kod BE, a potom slijedi inaktivacija p53 (također LOH-om ili mutacijama) što sve skupa dovodi do aneuploidije i tetraploidije.



Najvažnija zapreka adekvatnoj upotrebi biomarkera i kliničkih studija sa biomarkerima je nepostojanje velikih multicentričnih tkivnih (patohistoloških) baza podataka te prospektivno dugogodišnje praćenje bolesnika u svrhu adekvatne detekcije i izračuna statističke značajnosti razvoja HGD-a i adenokarcinoma zbog ipak kumulativno poprilično niskog rizika razvoja karcinoma. Proces razvoja i potvrde kliničke korisnosti biomarkera zahtijeva obavezno fazu 4 (prospektivne studije), fazu 5 (randomizirana kontrolirana ispitivanja) i fazu 6 (faza 4 i 5 provedena u multiplim centrima) kliničkih istraživanja, što je trenutno ograničeno brojem uzoraka, neadekvatnim dugogodišnjim praćenjem te cijenom. Napredak endoskopskih tehnika (high resolution endoscopy, NBI, autofluorescenca...) može omogućiti bolje prepoznavanje "suspektnih" područja mukoze te ciljane biopsije čime se smanjuje trošak do sada upotrebljivanih rutinskih biopsija (8-16 po pacijentu po jednoj endoskopiji), čime se povećava mogućnost bolje i ranije detekcije HGD-a i ranog adenokarcinoma.

#### 1.6. DIJAGNOZA BARRETT-ovog JEDNJAKA UZ KROMOENDOSKOPIJU

Dijagnoza BE se postavlja kombinacijom endoskopske slike cilindričnog epitela donjeg dijela jednjaka uz adekvatnu patohistološku potvrdu intestinalne metaplazije. Intestinalni tip epitela donjeg dijela jednjaka predstavlja jasnu patologiju i pronalaženje navedenog epitela u patohistološkim uzorcima potvrđuje dijagnozu BE. Osim intestinalnog, postoje i druge vrste epitela (najčešće želučanog-epitel kardije) za čije prisustvo još nema dokaza da predstavlja rizik od razvoja adenokarcinoma. Bolesnici kojima je patohistološki potvrđen želučani ili neki drugi epitel koji nije intestinalnog tipa, po definiciji nemaju BE. Endoskopski kriteriji, bez obzira na klasifikaciju bolesti, zahtijevaju ispravno prepoznavanje anatomskih „markera“ distalnog dijela jednjaka kojima bi se prepoznao BE i kojima bi se omogućila pravilna klasifikacija bolesti. Potrebno je prepoznati:

1. hiatus diafragme
2. prisustvo hijatalne hernije
3. gastroezofagealni spoj (GEJ) koji se nalazi na gornjoj granici želučanih nabora tokom parcijalne insuflacije zraka
4. granicu želučanog i epitela jednjaka (Z-linija; granica cilindričnog želučanog i višeslojnog pločastog epitela jednjaka)
5. udaljenost GEJ-a od Z-linije u centimetrima

Normalan izgled gastroezofagealne regije se endoskopski definira preklapanjem tri osnovna „markera“: GEJ-a, Z-linije te hiatusa dijafragme. Tradicionalno se smatra normalnim ako je udaljenost Z linije i GEJ-a manja od 1 cm. Po staroj klasifikaciji, BE se dijelio u dvije osnovne skupine:

1. „short segment BE“ (SSBE) kada je udaljenost GEJ-a i Z linije manja od 3 cm (slika 1)
2. „long segment BE“ (LSBE) kada je ta udaljenost preko 3 cm (slika 2 i 3)

Smatra se da je dužina segmenta BE važan rizični čimbenik u razvoju adenokarcinoma jednjaka, pogotovo kada je dužina preko 9 cm. Svejedno, SSBE također predstavlja rizik za displaziju i adenokarcinom tako da je princip uzimanja biopsija i praćenje tih bolesnika istovjetno onima sa LSBE.<sup>130</sup> Praška klasifikacija BE je u upotrebi od 2004.g, prvi put prezentirana na UEGW (United European Gastroenterology Week) u Pragu i ima za cilj pojednostaviti i standardizirati endoskopsku karakterizaciju metaplastične sluznice. Osim gore navedenih endoskopskih markera osnova Praške klasifikacije je definiranje najniže točke cirkumferentnosti (C) i najviše točke maksimalne ekstenzije (M) jezičaka želučane sluznice od GEJ-a. Kao početni parametar uzima se udaljenost GEJ-a od inciziva u centimetrima te potom mjeri C i M udaljenost. Oduzimanjem udaljenosti u centimetrima C i M od udaljenosti GEJ-a dobiva se točna klasifikacija BE (npr udaljenost GEJ od inciziva je 36 cm; udaljenost C od inciziva je 33 cm, a udaljenost M od inciziva 29 cm-daju nam vrijednosti C3;M7). Ovaj klasifikacijski sistem je pouzdaniji i reproducibilniji od dosadašnjeg, koeficijenti pouzdanosti su 0,91 za C te 0,66 za M i 0,72 za prepoznavanje BE dužeg od 1 cm.<sup>131</sup> BE vrlo često prati popratni ezofagitis koji može maskirati Barrett-ovu sluznicu, stoga se u tom slučaju savjetuje liječenje ezofagitisa najmanje 3 mjeseca prije uzimanja biopsija donjeg dijela jednjaka. Za razliku od kronične, aktivna upala može inducirati promjene koje simuliraju displaziju niskog ili visokog stupnja. Također su uz BE opisane i pojave stenoza u 15-40% te ulceracija u 60% slučajeva koja također povećavaju rizik od nastanka adenokarcioma.

Drugi aspekt postavljanja dijagnoze BE je patohistologija koja zahtijeva adekvatno i količinski dovoljno uzimanje bioptičkih uzoraka. Opisani su razni protokoli uzimanja bioptičkih uzoraka:

1. De-Meester: biopsije sluznice želuca, GEJ-a te svaka 1-2 cm metaplastičnog, Barrett-ovog epitela i to svaka kao odvojeni uzorak
2. Seattle protokol: biopsije Barrett-ove sluznice iz 4 kvadranta (12,3,6,9h) na svaka 1-2 cm uz dodatne biopsije zamijećene mukozne abnormalnosti (ulkus, nodul); svaki bioptički uzorak u zasebnu bočicu. Po zadnjim smjernicama savjetuje se uzimanje

biopsija na svaka 2 cm, a kod sumnje ili u slučaju već od prije poznate displazije epitela biopsije svakih 1 cm.<sup>132</sup>

Smatra se da je potrebno uzeti minimalno 8 biopsija (važno kod kraćih BE) jer povećanjem broja biopsija povećavamo mogućnost prepoznavanja intestinalne metaplazije (68% kod 8 biopsije naspram 34% kod 4 biopsije). Biopsije se uzimaju klasičnim bioptičkim kliještima (forcepsom), a uzimanje biopsija sa samog GEJ-a nije potrebno. Klasična endoskopija bez biopsija ima dosta ograničenja: makroskopski ne možemo ralikovati intestinalnu metaplaziju od želučane, a također ne možemo prepoznati displaziju. Funkcionalne testove kod BE upotrebljavamo na osnovu istih indikacija kao i kod GERB-a, u svakom slučaju ne rutinski. Tako manometrija omogućuje evaluaciju antirefluksne barijere (donji ezofagealni sfinkter, hipotonija, hijatalna hernija) te eventualne motoričke poremećaje (peristaltika jednjaka). pH-metrija često bilježi patološke vrijednosti kod pacijenata sa BE unatoč terapiji inhibitorima protonske pumpe. U studiji koja je uključivala pacijente sa GERB-om, BE-om te zdrave kontrole, 50% pacijenata sa BE-om su imali patološki refluks kiseline te češće noćni GERB („nocturnal-acid breakthrough“, NAB) unatoč IPP terapiji i unatoč tome što su bili većinom asimptomatski.<sup>133</sup> Nije nađeno jasno objašnjenje, no smatra se da nije riječ o rezistenciji na djelovanje IPP-a, već o tome da i mala količina kiseline zbog patofizioloških promjena (hijatalna hernija, smanjen tonus donjeg jednjačnog sfinktera) može djelovati na distalni dio jednjaka. Refluks žuči je poznati uzročnik razvoja BE, ali sama prisutnost žuči u želucu videna endoskopski nije dokaz patološkog duodeno-gastro-ezofagealnog refluksa. Bilitec-fiberoptički uređaj (portabilni spektrometar koji vrši apsorpciju na 450nm, što predstavlja valnu dužinu bilirubina) je najobjektivniji pokazatelj refluksa žuči, ali također nije u rutinskoj upotrebi.<sup>134</sup>

### 1.6.1. KROMOENDOSKOPIJA I NOVE DIJAGNOSTIČKE TEHNIKE

Povijesna uloga gastrointestinalne endoskopije je bila najčešće potvrda tumora u fazi razvijenih kliničkih simptoma. Današnje mjesto gastrointestinalne endoskopije je prepoznati neoplaziju ili displaziju (kao najveći rizik za razvoj neoplazije) u ranoj fazi kada pacijent nema kliničkih simptoma i kada, bilo endoskopska ili kirurška terapija, mogu dovesti do potpunog izlječenja bolesti. Konvencionalni endoskopi upotrebljavaju manje od 200000 piksela za izradu slike, stoga se prilikom približavanja vrha endoskopa sluznici javlja zamućena slika. Tehnološki napredak je doveo do boljih slika povećanjem rezolucije i upotrebom „high-definition“ monitora, tako da uvećanje slike ne prati gubitak rezolucije.

Endoskopi sa uvećanjem kao i endomikroskopi omogućavaju pregled tkiva do staničnih komponenti (in-vivo histologija).

Tokom zadnjih par godina razvile su se mnogobrojne endoskopske tehnike upravo radi boljeg prikaza patoloških struktura gastrointestinalnog trakta:

1. klasična kromoendoskopija kada se kateterom apliciraju različita kontrastna sredstva-boje

2. endoskopske metode poboljšanog prikaza površine sluznice probavne cijevi ("high definition"

endoskopija, prikaz uskopojasnim spektrom- eng. "Narrow band imaging"-NBI, kompjutorizirana virtualna kromoendoskopija)

3. funkcionalni prikaz sluznice i podsluznice probavnog trakta (autoflorescencija, Ramanova i

spektroskopija elastičnog rasapa)

4. endoskopske metode slikovnog prikaza slojeva stijenke probavne cijevi (optička koherentna

tomografija, konfokalna endomikroskopija, endoskopska cistoskopija)<sup>135</sup>

U rutinskoj upotrebi za dijagnosticiranje i praćenje BE najčešće se upotrebljava klasična kromoendoskopija te optičke tehnike (NBI, "Fujinon Image Contrast Enhancement"-FICE, i digitalna kontrastna metoda, I-Scan)

Osim jasnog razloga ranog otkrivanja mogućih premalignih lezija probavne cijevi, prednost kromoendoskopskih tehnika je smanjenje broja „slijepih“ biopsija te uzimanje ciljanih biopsija koje patologu omogućavaju lakše prepoznavanje displazije ili početnog karcinoma. Trenutno upotrebljavani Seattle protokol slijepih biopsija BE svakih 2 cm te biopsija svake mukozne abnormalnosti ima svojih nedostataka u prvom redu radi fokalnog, a ne kontinuiranog rasporeda displazije, što može dovesti do lažno negativnih nalaza kada se upotrebljava klasična endoskopija bijelim svjetlom. Po drugoj strani broj ciljanih biopsija je najčešće manji od broja slijepih (kojih mora biti najmanje 8) što uvelike skraćuje trajanje endoskopskog postupka.

Klasična kromoendoskopija uključuje topičku aplikaciju boje ili pigmenta putem katetera nakon čišćenja donjeg dijela jednjaka od sluzi uporabom mukolitika (acetilcistein) radi boljeg prikaza lokalizacije i karakteristika lezija. Boje se dijele na apsorptivne, kontrastne i reaktivne. Apsorptivne (Lugol, metilensko modriilo) se apsorbiraju putem membrana epitelnih stanica. Kontrastne (indigo karmin) naglašavaju površinsku topografiju i mukozne

iregularnosti ulazeći u mukozne pukotine. Reaktivne boje (kongo i fenol crvenilo) ulaze u različite kemijske reakcije sa staničnim komponentama te time dovode do promjene boje.

Kromoendoskopija se najčešće upotrebljava u kombinaciji sa drugim endoskopskim tehnikama kao što je magnifikacija, konfokalna endomikroskopija te endocistoskopija.

Kromoendoskopija je od svih novih endoskopskih tehnika široko dostupna, jednostavna, brza, jeftina i sigurna, ali kao i kod ostalih metoda interpretacija nalaza je subjektivna i njezina prednost pred standardnom endoskopijom nije potvrđena u velikim kontroliranim studijama. Također nedostatak svih kromoendoskopskih metoda su lažno pozitivni nalazi kod popratnog ezofagitisa kojeg je potrebno liječiti inhibitorima protonske pumpe pa tek nakon 3 mjeseca terapije treba uraditi kromoendoskopsku pretragu.

Lugolova otopina (20 do 30 ml 1,5-3%) se apsorbira u normalnim stanicama pločastog epitela koje imaju glikogen, tako da će stanice intestinalne metaplazije (vrčaste stanice), displazije ili tumora ostati nebojane, ali nebojana ostaje i regija teškog ezofagitisa (upalne stanice). Malo je kontroliranih studija uporabe lugola kod BE-a, ali lugol ima svoje mjesto u prvom redu u boljem prepoznavanju i određivanju točnih granica Barrett-ove sluznice te prepoznavanju otočića Barrett-ovog tkiva nakon ablativne terapije<sup>136</sup>. Metilensko modriilo (0,5%) boji urednu sluznicu tankog i debelog crijeva te također pokazuje pojačanu apsorpciju od strane tkiva intestinalne metaplazije (jednaka-BE i želuca). Pojačano nakupljanje boje se definira kao tamno-plavo obojana mukoza koja perzistira unatoč ispiranju vodom, dok areali smanjenog intenziteta plave obojanosti mogu odgovarati žarištima displazije ili karcinoma. Veliki broj studija i metaanaliza pokazuje izrazito šarolike rezultate (osjetljivost 32-98%, specifičnost 23-100%) uz veliku intraopservacijsku varijabilnost koja ovisi o iskustvu endoskopičara, tehnici bojenja te interpretaciji samog nalaza.<sup>137</sup> Zadnja metaanaliza iz 2009 nije našla prednost kromoendoskopije metilenskim modrilom naspram slijepih biopsije u dokazivanju bilo metaplazije bilo displazije epitela.<sup>138</sup> Kontroliranih studija sa drugim kromoendoskopskim tehnikama (kristal violet, indigo karmin) ima vrlo malo. Octena kiselina (3%) u kombinaciji sa magnifikacijskom endoskopijom u prospektivnim studijama<sup>139</sup> pokazuje osjetljivost 52-90% u dijagnostici intestinalne metaplazije, ali se nije pokazala kao bolja metoda u prepoznavanju displazije ili ranog karcinoma. Ona se također upotrebljava za dokaz zaostalih otočića Barrett-ove sluznice nakon endoskopske terapije (prepoznaje 52% više otočića koji se nisu vidjeli klasičnom endoskopijom. Endoskopski prikaz NBI-om predstavlja "high-resolution" endoskopsku tehniku koja naglašava fine strukture mukozne površine bez upotrebe boje. NBI tehnika se zasniva na fenomenu da dubina prodora svjetla u sluznicu ovisi

o njegovoj valnoj dužini: što je veća valna dužina, penetracija je dublja. Bijelo svjetlo iz ksenonske lampe prolazi kroz RGB filter koji ga lomi u crveno, zeleno i plavo svjetlo te se obasjava sluznica po principu da plavo svjetlo prodire samo površinski dok crveno prodire u submukozu, a dodatno hemoglobin apsorbira i plavo svjetlo te tako omogućuje prikaz krvnih žila. Reflektirano crveno, zeleno i plavo svjetlo se detektira monokromatskim CCD ("monochromatic charged coupled device") uređajem koji se nalazi na vrhu endoskopa te se tri slike spajaju u jednu putem procesora. NBI filteri se ručno mogu uključiti i isključiti tokom same endoskopije pritiskom na gumb koji se nalazi u sklopu endoskopa te time imaju prednost pred klasičnom kromoendoskopijom jer ne zahtijevaju upotrebu boje i omogućuju pregled cijelog endoskopskog vidnog polja. NBI tehnologija nam omogućuje detaljni prikaz mukoznih i krvnožilnih abnormalnosti te se dogovorno razlikuju 3 tipa mukoznih te 2 tipa vaskularnih uzoraka:

1. mukozni uzorak („pit pattern“): *striated/villous; circular i irregular/distorted*
2. vaskularni uzorak („vascular pattern“): normalni ili abnormalni

Pravilni mukozni i vaskularni uzorak te „flat“ mukoza označavaju intestinalnu metaplaziju, dok je prikaz iregularne mukoze i vaskulatura te abnormalnih krvnih žila specifičan za displaziju visokog stupnja (osjetljivost 90-100%). Time se omogućava veći broj ciljanih, a manji broj slijepih biopsija.<sup>140</sup> Klasifikacijski sistemi NBI-a još nisu do kraja razrađeni i potvrđeni u prospektivnim studijama, ali ipak po zadnjoj meta analizi NBI se pokazao jednako učinkovit kao „slijepe“ biopsije u dokazu intestinalne metaplazije, a učinkovitiji u dokazu displazije ili ranog karcinoma.<sup>141</sup> Autofluorescenca (AFI) upotrebljava tkivne fluorofore (kolagen, elastin, nikotinamid) koji emitiraju fluorescentno svjetlo duže valne duljine kada su obasjani bijelim svjetlom kraće valne duljine. Normalno tkivo daje zelenu boju, dok su areali displazije svijetlo ljubičaste boje. Potrebne su daljnje prospektivne „in-vivo“ studije da bi se verificirala korist ove metode, početni rezultati „in-vitro“ studija na kirurškim resekcijskim materijalima su pokazali veći stupanj fluorescence u području adenokarcinoma naspram displaziji ili metaplaziji. FICE i I-Scan pretvaraju klasičnu endoskopsku sliku procesuirajući reflektirane fotone čime vrše rekonstrukciju virtualne slike pojačavajući intenzitet suženog plavog svjetla na maksimum, a suženog crvenog i zelenog svjetla na minimum. Zbog različite apsorpcije svjetla od strane hemoglobina dolazi do boljeg prikaza mikrovaskulature i mukoznih abnormalnosti. Po recentnim studijama uz pomoć FICE olakšano je postavljanje dijagnoze BE (bolja demarkacija Barrett-ove i želučane sluznice), dok je I-Scan za sada potvrđen kao metoda kojom se bolje prepoznaju refluksne promjene.

Obje tehnike zahtijevaju veći broj studija koje bi potvrdila njihovu učinkovitost u dijagnozi i praćenju BE.

Protočnom citometrijom se može detektirati aneuploidija ili G2/tetraploidija koji predstavljaju markere neoplastične progresije, ali nažalost zbog skupoće još nije dostupna u kliničkoj praksi. Balon citologija je metoda koja ne zahtijeva endoskopiju; naime balonom se dobivaju stanice koje se citološki analiziraju. Trenutno je najveći problem skupljanje dovoljnog broja stanica i s dovoljno velike površine jednjaka kako bismo dobili reprezentativni uzorak za detekciju displazije ili karcinoma.

Imunobojanje alfa-metilacil-CoA-racemazom (AMACR) ima veliki stupanj specifičnosti u detekciji displazije, jer pokazuje pojačanu ekspresiju u displaziji niskog stupnja (38%), visokog stupnja (81%) te karcinomu (72%). Specifičnost detekcije displazije je 100%.<sup>142</sup> 5-aminolevulanska kiselina (5-ALA) se intracelularno konvertira u protoporfirin IX koji se akumulira u neoplastičnom tkivu i prepoznaje se crvenom fluorescencijom nakon obasjavanja bijelim svjetlom endoskopski. Potrebna su daljnja istraživanja radi usporedbe efikasnosti ove metoda naspram „slijepih“ biopsija.

Konfokalna endomikroskopija producira mnoštvo horizontalnih presjeka koji čine trodimenzionalni, mikroskopski prikaz sluznične arhitekture (in vivo histopatološki prikaz) te omogućuje endoskopičaru postavljanja patohistološke dijagnoze tokom endoskopije i bez uzimanja bioptičkih uzoraka. Konfokalna endomikroskopija nam pruža simultanu endoskopsku i mikroskopsku sliku to jest omogućuje ciljani endomikroskopski prikaz makroskopski suspektne lezije. Lokalna aplikacija acriflavina (0,02%) ili sistemska aplikacija flourescina (10%) omogućuju izvrstan prikaz tkivne arhitekture (krvnih žila, stanica i vezivnog tkiva). S obzirom da je riječ o „najmlađoj“ endoskopskoj tehnici, velikih prospektivnih studija još nema, ali preliminarni rezultati ukazuju na visoku specifičnost i osjetljivost u detekciji displazije.<sup>143</sup>

Po zadnjim AGA smjernicama iz 2015 elektronska kromoendoskopija se preporučuje u rutinskom praćenju bolesnika sa BE, posebno kod pacijenata sa poznatom displazijom ili mukoznim iregularnostima

## 1.7. TERAPIJA BARRETT-ovog JEDNJAKA

Liječenje GERB-a u pacijenata sa BE-om se ne razlikuje od liječenja onih sa GERB-om bez BE-a. Jedina razlika može biti u tome da se kod bolesnika sa BE-om češće odmah uvode inhibitori protonske pumpe (IPP), a ne “step-up” terapija (antacid, H2 blokator). Kod

bolesnika sa popratnim endoskopski dokazanim ezofagitisom te simptomima GERB-a, upotreba IPP nije upitna, međutim kod bolesnika sa BE-om bez GERB-a, upotreba IPP bi bila isključivo radi kemoprevencije progresije u displaziju ili adenokarcinom što nije potvrđeno u velikim kontroliranim studijama. Stoga po smjernicama spomenutog Američkog gastroenterološkog društva odluka o dugotrajnoj IPP terapiji bi trebala biti donešena u dogovoru sa bolesnikom uzimajući u obzir njegovo opće stanje, popratne bolesti te moguće nuspojave. Antirefluksna kirurgija (funduplikacija) je također opcija kontrole GERB-a kod pacijenata sa BE-om, međutim zbog komplikacija i upitnog ishoda, nema prednosti pred farmakološkom terapijom.<sup>144,145</sup> Temeljem nekoliko istraživanja postavljena je sumnja na nedovoljno djelovanje IPP-a u bolesnika sa BE-om,<sup>146</sup> međutim ipak je potvrđeno da pacijenti imaju adekvatan odgovor na IPP, ali da zbog tzv “refluksne dijateze” i mala količina želučane kiseline može biti odgovorna za perzistenciju tegoba. Povišenje doze IPP i dodavanje noćne doze H2 blokatora je dobra opcija za trajno simptomatske bolesnike, pogotovo kod “nocturnal-acid breakthrough” (NAB).<sup>147</sup> In vitro studije također ukazuju da agresivna antisekretorna refluksna terapija može biti odgovorna u prevenciji nastanka adenokarcinoma, naime epizodična ekspozicija distalnog jednjaka kiselinu dovodi do hiperproliferacije, suprimiranja apoptoze te promocije karcinogeneze.<sup>148</sup> Bolesnici kojima je uvedena IPP terapija i kojima je nakon 6 mjeseci terapije normaliziran pH distalnog dijela jednjaka imali su histološki dokazanu smanjenu ekspresiju PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”), a ekspresija markera diferencijacije vilina je porasla.<sup>149</sup> Agresivna antirefluksna terapija može dovesti do regresije intestinalne metaplazije kod BE-a<sup>150</sup> pa je sprječen nastanak displazije. Stupanj regresije je klinički signifikantan jer oporavljeni (novi) višeslojni pločasti epitel ima isto biološko ponašanje kao i normalni epitel jednjaka.

#### 1.7.1. TERAPIJA BOLESNIKA S DISPLAZIJOM EPITELA VISOKOG STUPNJA

Liječenje bolesnika s HGD-om uključuje četiri moguća postupka:

1. ezofagektomija
2. endoskopska ablativna terapija
3. endoskopska mukozna resekcija (EMR)
4. intenzivno endoskopsko praćenje bez terapije dok se ne potvrdi dijagnoza adenokarcinoma.



Sva četiri postupka su praćena određenim rizicima te još nejasnom trajnom koristi, većinom zbog toga što follow-up pacijenata u nijednoj studiji nije duži od 5 godina tako da se još ne može reći o koristi navedenih strategija liječenja u eventualnom smanjenju smrtnosti od adenokarcinoma. Ipak dvije “cost-effective” analize su došle do zaključka da endoskopska ablacijska terapija pruža šansu najvećeg preživljenja s obzirom na kvalitetu života.<sup>151,152</sup> Smjernica Američkog gastroenterološkog društva iz 2015 sugeriraju da je kombinacije endoskopskih terapija (EMR uz ablacijske metoda) trenutno najbolja metoda liječenja HGD-a. Kod bilo kakve vidljive mukozne abnormalnosti potrebno je uraditi endoskopsku resekciju lezije (“staging” ER) pa ako dobiveni uzorak ukaže da je riječ isključivo o HGD-u ili intramukoznom karcinomu (koji je mukoznom resekcijom odstranjen) tada je potrebno nakon 2 mjeseca uraditi ablacijsku terapiju preostale sluznice BE. Ako pak nema endoskopski vidljivih lezija pogodnih za EMR, tada je prva i jedina terapija endoskopska ablacija.

Ezofagektomija je jedina metoda kojom se potpuno uklanja cijeli neoplastični epitel (uključivo i moguće okultno tj neprepoznato žarište karcinoma). Međutim, kirurški zahvat nosi najveći rizik od komplikacija i smrtnosti koji ovisi o iskustvu operatera i godišnjem broju ezofagektomija (smrtnost od 3-12%). Prosječni boravak u bolnici je 2 tjedna, u 30-50% bolesnika nastaje najmanje jedna ozbiljna komplikacija poput pneumonije, aritmije, infarkta miokarda, srčanog zatajenja ili infekcije rane, a dugoročni problemi uključuju disfagiju, gubitak tjelesne težine, GERB te dumping sindrom.<sup>153</sup> Rizik od komplikacija i smrtnosti je ipak nešto niži kada se analiziraju samo podaci bolesnika koji su operirani zbog početnog karcinoma na podlozi BE-a, a isključe operacije zbog proširene bolesti ili planocelularnog karcinoma. Rizik od metastaziranja u limfne čvorove kod bolesnika sa intramukoznim karcinomom iznosi 1-2%. Kada se pojave metastaze u regionalne limfne čvorove tada je ezofagektomija metoda izbora.

Endoskopske ablativne tehnike uključuju metode kojima se termički, fotokemijski ili radiofrekventnom energijom uništava sluznice BE. Opisan je velik broj metoda: KTP laser, argon laser, Nd:YAG laser, multipolarna elektrokoagulacija, argon plazma koagulacija, fotodinamska terapija i radiofrekventna ablacija (RFA). Nakon ablativne terapije bolesnici moraju uzimati IPP koji svojim antisekretornim djelovanjem omogućuje cijeljenje sluznice jednjaka odnosno rast novog pločastog epitela. Najvažniji nedostatak ablativnih terapije je vjerojatna nemogućnost eradikacije svih displastičnih stanica. Parcijalna urađena ablacija može dovesti do stvaranja površnog sloja planocelularnog epitela, međutim taj epitel može

sakriti “buried” metaplastično tkivo koje daje osnovu za razvoj adenokarcinoma.<sup>154</sup> Retrospektivna studija<sup>155</sup> kojom je istraživana uspješnost ablacijskih terapija (fotodinamska terapija, RFA i argon plazma koagulacija) uključila je 166 bolesnika kod kojih je postignuta kompletna eradikacija intestinalne metaplazije (IM) u 157 pacijenata, a rekurentna IM je zabilježena u 48 pacijenata, od čega displazija u 12. Konačni zaključak za definiranje mjesta ablacijskih terapija u liječenju BE-a još ne postoji zbog nepostojanja velikih meta analiza, međutim “cost-effectiveness” analiza ukazuje na moguću korist od ablacija bolesnika sa displazijom, čak i bez displazije, zbog dobre efikasnosti metode te koristi od prestanka endoskopskog praćenja bolesnika.<sup>156</sup>

Radiofrekventna ablacija (RFA) je najnovija i vjerojatno najefikasnija ablacijska metoda koja se provodi radiofrekventnom energijom koja se isporučuje putem balon katetera za cirkumferentnu ablaciju (RFA 360) ili ablacijskih katetera (RFA 60,90) za fokalnu ablaciju opremljenih posebnim elektrodama. Prednost RFA pred ostalim metodama je brza isporuka energije na širem području Barrett-ove sluznice koja dovodi do kontrolirano duboke termalne ozljede te stoga smanjuje rizik od “buried” metaplazije te od formiranja striktura. Brojne studije su provedene s RFA-om u terapiji BE-a. Na temelju rezultata tih studija preporuča se terapija s RFA-om bolesnicima sa HGD-om.<sup>156-159</sup> Najveća studija je uključila 127 bolesnika sa displazijom epitela koji su bili podijeljeni u skupinu s RFA-om i bez nje (kontrolna skupina-liječena antisekretornom terapijom). Nakon jedne godine u skupini sa ablacijom postignuta je kompletna eradikacija kod 91% bolesnika sa LGD-om te u 81% onih sa HGD-om naspram 3% kod LGD-a i 19% kod HGD-a u kontrolnoj skupini.<sup>160</sup>

Fotodinamska terapija se zasniva na sposobnosti nekih fotosenzibilnih kemijskih agensa poput photofrina II, 5ALA (aminolevulinska kiselina), mTHPC (meso tetrahidroksifenilklorin) koje, kada se daju bolesnicima, apsorbiraju maligne stanice. Nakon stimulacije i aktivacije fotosenzibilne tvari laserskim svjetlom male valne dužine pomoću endoskopa, dobivena energija se pretvara u molekularni kisik koji ima citotoksični učinak na maligne stanice. Metoda je nešto bolja u eradikaciji displazije naspram IPP terapije, ali je česta nuspojava suženje jednjaka, a ostaju neke genetske abnormalnosti. Endoskopska sprej krioterapija koristi hladni nitrogen ili ugljični dioksid kojima se tkivo smrzava u trajanju 40 sekundi. U studiji 60 bolesnika sa HGD-om, u 58 (97%) je postignuta kompletna eradikacija HGD-a, u 52 (87%) kompletna eradikacija cjelokupne displazije, a 34 (57%) bolesnika kompletna eradikacija cijele sluznice BE-a.<sup>161</sup>

Endoskopska resekcija uključuje endoskopsku mukoznu resekciju (EMR) te endoskopsku submukoznu disekciju (ESD) kojima se vrši ekscizija većeg segmenta sluznice (EMR do 20 mm, ESD i više). Prednost ovih metoda je u prikupljanju tkiva za patohistološku analizu. Naime odstranjeni uzorci su vrlo reprezentativni i omogućuju dobru histološku analizu lezije u svim slojevima, mukoznim i submukoznim, pa je moguće procijeniti jesu li tim zahvatom odstranjene displazija ili rani karcinom, odnosno moguće je procijeniti potrebu za kirurškim zahvatom. Više je studija provedeno u ispitivanju EMR u liječenju ranog karcinoma. U najvećoj od njih<sup>162</sup> uključeno je 100 bolesnika sa ranim karcinomom. Petogodišnje preživljenje nakon EMR bilo je 98%, bez većih komplikacija. Međutim kod 11% bolesnika uočena je pojava rekurentnog ili metakronog karcinoma koji su također liječeni EMR-om, ali to ukazuje na mogućnost postojanja ostatnih stanica neoplastičnog potencijala i nakon terapije. Rizični faktori za pojavu metakronih tumora predstavlja dugački BE, multipli fokusi displazije, komadna (piecemeal) resekcija te neadekvatna ablacija rezidualne sluznice nakon ER. Najvažnija studija kojom je donesen konačni zaključak o terapiji HGD-a i ranog karcinoma je ona kojom je uspoređena "stepwise" EMR za eradikaciju cijele sluznice BE-a te kombinacija EMR-a za vidljive lezije uz RFA za ostatnu sluznicu BE.<sup>163</sup> U obje grupe zabilježen je visoki stupanj kompletne remisije IM i neoplazije (96-100%), međutim rizik od stenoze jednjaka je bio puno veći u prvoj grupi (88 naspram 14%).

Intenzivno endoskopsko praćenje pacijenata s HGD-om (svakih 3-6 mjeseci) bez terapije dok ne dođe do razvoja adenokarcinoma je također opcija ali većinom kod starijih ljudi uz brojne komorbiditete kojima je endoskopska ili kirurška terapija kontraindicirana. Kod mlađih ljudi je provedena jedna veća studija<sup>164</sup> s 75 pacijenata. Tokom praćenja od 7 godina karcinom je zabilježen u njih 12 i svi su bili kirurški operabilni.

Endoskopska terapija pacijenata s LGD-om i bez displazije najčešće u praksi uključuje ablativnu terapiju (RFA), iako efikasnost te korist terapije još nije validirana randomizirnim studijama te meta-analizama. Ipak smjernice Američkog gastroenterološkog društva<sup>165</sup> savjetuju da je bolesnicima sa BE bez displazije korisno učiniti RFA ako imaju rizik od nastanka HGD ili adenokarcinoma jednjaka. RFA je opcija za eradikaciju LGD u bolesnika sa BE, ali liječnik zajedno sa bolesnikom odlučuje o primjeni RFA ili o stalnom endoskopskom praćenju s biopsijama sve dok se u dva uzastopna praćenja histološki dokaže da više nema LGD. Trenutno se ipak, po smjericama, ne preporuča niti ablativna niti resekcijska terapija

u gore navedenih skupina bolesnika već endoskopsko praćenje uz biopsije (6-12 mjeseci sa LGD te 3-5 godina bez displazije).

Mnoga nacionalna endoskopska društva su izdala smjernice praćenja i liječenja bolesnika sa BE, a razlike u smjernicama ukazuju na brojna otvorena i neriješena pitanja. Najprihvatjive se čine smjernice Američkog gastroenterološkog društva (AGA) iz 2015:<sup>165</sup>

1. Probir za BE je indiciran kod ljudi sa rizičnim faktorima (preko 50 godina, muškarci, bijelci, kronični GERB, hijatalna hernija, povišen BMI, intraabdominalna raspodjela masnog tkiva)
2. Probir za BE nije potreban u općoj populaciji
3. Dijagnoza displazija zahtijeva potvrdu drugog patologa (eksperta u GI patologiji)
4. Endoskopsko praćenje se provodi po slijedećem principu: BE bez displazije 3-5 godina, LGD 6-12 mjeseci, HGD (ako se ne odlučimo za terapiju) 3 mjeseca
5. Molekularni biomarkeri trenutno nisu dio rutine u praćenju bolesnika ili stratifikaciji rizika.
6. Upotreba ASK-e ne sprječava razvoja adenokarcinoma i navedeno ne bi smjelo biti jedina indikacija za uvođenje ASK-a u terapiju.
7. IPP je indiciran u liječenju popratnog ezofagitisa, međutim dugotrajna upotreba IPP ne smanjuje rizik od progresije prema karcinomu i treba biti detaljno raspravljena sa pacijentom.
8. Endoskopsko praćenje zahtijeva upotrebu endoskopa sa bijelim svjetlom visoke rezolucije uz biopsije iz 4 kvadranta na svaka 2 cm (svaki 1 cm kod već poznate displazije) te odvojene biopsije mukoznih iregularnosti
9. Kromoendoskopija bi trebalabiti dio rutine u praćenju bolesnika sa BE, posebno kod pacijenata sa displazijom ili nodularnostima sluznice
10. Endoskopske ablativne tehnike ili endoskopska resekcija indicirani su kod bolesnika sa HGD-om, dok svaka mukozna abnormalnost zahtijeva “staging” EMR.

## 1.8. ENDOSKOPSKO PRAĆENJE

Endoskopsko praćenje bolesnika s BE-om se zasniva na činjenici povišenog rizika od razvoja adenokarcinoma jednjaka te pretpostavci da praćenje utječe na preživljenje bolesnika i na smanjenje smrtnosti. Te pretpostavke ipak još nisu potvrđene u randomiziranim studijama.<sup>166</sup> Godišnja incidencija adenokarcinoma jednjaka kod pacijenata sa BE je od 0,1-2%,<sup>167</sup> međutim rizik od razvoja karcinoma ovisi od faze BE-a. Tako je dokazano da je rizik od karcinoma kod nedisplastičnog BE-a 0,3% godišnje, BE-a sa LGD-om 0,5-1% godišnje, a kod prisutnog HGD-a 9% (6-20%) godišnje.<sup>168</sup> Muškarci sa BE-HGD-om imaju dvostruko viši rizik od razvoja karcinoma nego žene sa potvrđenom HGD.<sup>169</sup> Općenito, adenokarcinom jednjaka nije česti uzrok smrti bolesnika s BE-om, a to objašnjavamo dobi pacijenata u kojoj su izloženi drugim, češćim bolestima. Međutim opservacijske studije su pokazale da endoskopsko praćenje može otkriti početnu fazu displazije, koju je moguće izliječiti, kao i asimptomatske (rane) karcinome koje je također moguće izliječiti.<sup>170,171</sup> Najveća epidemiološka studija<sup>172</sup> koja je pokušala dati odgovor o prirodnom tijeku bolesti uključila je 618 bolesnika u praćenju od 4 godine. Tokom tog perioda 100 bolesnika (16%) je razvilo LGD, 22 (3,6%) HGD, a 12 (1,9%) karcinom. Godišnja incidencija LGD-a je bila 4,3%, HGD-a 0,9%, a karcinoma 0,5% godišnje. Ishod bolesnika sa LGD-om je bio slijedeći: regresija u ne-displastični BE bila je 66%, perzistentna LGD u 21%, pojava HGD-a u 10%, a karcinoma u 3,2%. Nije bilo razlike između ponašanja i tijeka bolesti kod BE dugog (preko 3 cm) naspram kratkog segmenta. Problem endoskopskog praćenja je i točna detekcija displazije. Oslanjajući se samo na "random" biopsije po Seattle protokolu, vrlo lako mogu promaknuti areali displazije i ranog karcinoma.<sup>173,174</sup> Dobrom endoskopskom tehnikom sa pažljivim i dovoljno dugim promatranjem sluznice BE-a te upotrebom kvalitetnih H-D endoskopa visoke rezolucije manja je mogućnost da previdimo suspektna mjesta Barrettove sluznice. Smatra se da je detaljna endoskopska inspekcija postignuta ako se provede 1 min po 1 cm dužine BE isključivo promatrajući sluznicu. Upotreba kromoendoskopije i njeno mjesto u praćenju bolesnika je opisano u gornjem poglavlju. Zaključno, uz sve dosadašnje napredne tehnike (bilo endoskopke, bilo molekularne-biomarkeri, bilo patohistološke) još nije pronađena moguća adekvatna zamjena dosadašnjim preporukama, a to su dovoljno dugo vrijeme inspekcije Barrettove sluznice H-D endoskopom sa bijelim svjetlom.

## 1.9. SUSTAV POPRAVKA POGREŠNO SPARENIH BAZA

DNA sustav popravaka krivo sparenih baza (mismatch repair-MMR sustav) predstavlja jedan od najvažnijih sustava u osnovi karcinogeneze i najviše je ispitan kod kolorektalnog karcinoma (sporadičnog i nasljednog-Lynch sindrom). Poremećaj MMR sustava dovodi do skoro 1000 puta učestalijih grešaka DNA tokom replikacije. U osnovi DNA MMR sustav sudjeluje u ispravljanju grešaka sparenih DNA baza u novonastaloj uzvojnici DNA. Većinu navedenih grešaka (oko 99%) ispravlja DNA polimeraza, međutim dosta često promaknu krivo spojeni nukleotidi i kratke insercijsko/delecijske mutacije koje se većinom pojavljuju u ponavljajućim nizovima. Navedeni nizovi se nazivaju mikrosateliti i sastoje se od ponavljajućih nizova nukleotida (6 ili manje) koji poprilično često promaknu kontroli i popravku DNA polimeraze. MMR sustav služi u prepoznavanju i popravljajući navedenih grešaka, a ako je on inaktiviran, nastaje posljedično skraćenje mikrosatelita koje dovodi do mikrosatelitske nestabilnosti (MSI). Laički rečeno, MMR sustav “skenira” DNA nakon DNA polimeraze i tako djeluje kao drugi osigurač adekvatne DNA sinteze. Kada MMR sustav otkrije grešku (krivo sparane baze nukleotida), istu odmah i korigira (isječe iz DNA lanca), a potom DNA polimeraza ponovi sintezu dijela lanca trajno ispravljavajući uočenu grešku. Postoje 4 osnovne faze DNA MMR sustava:

1. prepoznavanje krivo sparenih baza
2. aktivacija enzima važnih za popravljavanje
3. isjecanje navedene sekvence
4. resinteza ispravnog lanca

Obitelj humanih MMR proteina koji su odgovorni za prepoznavanje krivo sparenih baza se naziva hMSH (human MutS Homolog). Najvažniji proteini navedenog sustava su MSH2 (mutS homolog 2), MLH1 (mutL homolog 1), MSH6 (mutS homolog 6), PMS2 (postmeiotic segregation increased 2) i MSH3 (mutS homolog 3) i uvijek djeluju kao heterodimeri. Kada se prepozna krivo sparana baza formiraju se navedeni heterodimeri: MutS alfa je koji se sastoji od jedne molekule MSH2 i MSH6 i najčešći je oblik MutS; s druge strane MutS beta se sastoji od MSH2 i MSH3. MSH2/6 prepoznaje krivo sparene baze te kratke petlje insercije/delecije dok MSH2/3 prepoznaje dugačke petlje insercije/delecije. U svom djelovanju MutS protein formiraju “klizajuću stezaljku” koja se inicijalno zakvači na DNA na mjestu krivo sparenih baza te potom kliže lateralno duž cijele uzvojnice.<sup>175,176</sup> MSH protein ima jedno vezno mjesto za ATP čija prisutnost određuje karakteristike vezanja MutS

kompleksa; kada je vezan ADP, MutS je učvršćen za krivo sparane baze; kada je vezan ATP tada MutS putuje duž DNA uzvojnice. Kompleks DNA-MutS-ATP aktivira MutL kompleks (heterodimer koji se sastoji od MLH1 te PMS2 proteina). Postoje također tri tipa MutL kompleksa: MutL alfa koji se sastoji od MLH1 i PMS2, MutL beta MLH1 i PMS1 te MutL gama MLH1 i MLH3. MutL djeluje kao sustav koji zamjenjuje DNA polimerazu i aktivira egzonukleazu 1 (Exo1) i druge proteine nužne za eksciziju (u jednom aktu može se izrezati do kilobaza DNA uzvojnice). U cijelom procesu sudjeluju i RPA (replication protein A) koji stabilizira drugi DNA lanac i odgovoran je za prekid ekscizije nakon što je krivo sparana baza odstranjena. Nakon ekscizije DNA polimeraza i DNA ligaza klasičnim putem sintetiziraju novi DNA lanac čime je završen popravak.

MMR sustav je reguliran brojnim putevima i odgovara na brojne podražaje. Najveća razina MMR proteina se nalazi u stanicama koje se brzo dijele. Hipoksija može uzrokovati pojavu većeg broja stanica kojima je oštećen MMR sustav te time dovodi do povećanja mikrosatelitske nestabilnosti tumora.<sup>177,178</sup> Oksidativni stres, pogotovo u fazi jake upale, dovodi do “down” regulacije MMR sustava.<sup>179</sup> Bcl-2 je anti-apoptotički protein koji je pojačano eksprimiran kod određenih tumora te je dokazano da ima direktan utjecaj na MMR sustav tako što sprječava njegovu aktivnost.<sup>180</sup> Intranuklearna lokalizacija MMR proteina je najvažnije za njihovo djelovanje. Oni moraju biti u jezgri kako bi mogli sudjelovati u popravku DNA. Premještanje proteina u jezgru je pod utjecajem DNA alkilirajućih čimbenika,<sup>181</sup> a i bilo kakvo oštećenje DNA sudjeluje u direktnom prebacivanju proteina u jezgru.<sup>182</sup> Jedan od najvažnijih karcinogena, kadmij, inhibira MMR sustav te time povećava učestalost mutacija za 2000 puta.<sup>183</sup>

Uzroci greške MMR sustava mogu biti:

1. nasljedne mutacije bilo kojeg od MMR gena-najčešće MSH2, MLH1, MSH6 ili rjeđe PMS 1 ili 2 važne za nastavak hereditarnog nepolipoznog kolorektalnog carcinoma (HNPCC)
2. somatska inaktivacija MLH1 uzrokovana hipermetilacijom u 15% sporadičnih kolorektalnih karcinoma.<sup>184</sup>

U stanicama kod kojih postoji MMR mutacija dolazi do mutacije ključnih gena koji reguliraju staničnu proliferaciju i apoptozu. Originalne Bethesda smjernice<sup>185</sup> predložile su panel od 5 mikrosatelitskih markera za zajedničku analizu mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) u HNPCC.

Navedeni panel je sadržavao 2 mononukleotidna (BAT-25 i BAT-26) te tri dinukleotidna (D5S346, D2S123 i D17S250) ponavljanja. Uzorci kod kojih je nestabilnost postojala u dva ili više ponavljanja su klasificirani kao MSI-high (MSI-H), dok oni sa jednim nestabilnim ponavljanjem kao MSI-low (MSI-L). Uzorci kod kojih nije bilo abnormalnosti klasificirani su kao MSI-stabilni (MSS). S obzirom da je dokazano da su mononukleotidni markeri osjetljiviji, provedena je revizija originalne klasifikacije 2002 koja je uključivala sekundarni panel mononukleotidnih markera (kao BAT-40) te isključivanje klasifikacije MSI-L kada su samo dinukleotidni slijedovi mutirani.<sup>186</sup> Po tim novim smjernicama osjetljivost verifikacije MSI se povećala na 81,8%, a specifičnost na 98%. Klasifikacija se zasniva na slijedećoj podjeli: MSI-H kada je nestabilnost dokazana u više od 30% lokusa, MSI-L između 10-30% lokusa, a MSS kod manje do 10% lokusa.

Osnova nastanka tumora kod HNPCC je MSI. Najčešće pola ili više mikrosatelita iskazuje mutacije u tumorskim stanicama, stoga MSI može poslužiti kao izvrsni marker poremećaja MMR sustava. Postoje dva osnovna načina dokazivanja MSI: genetsko testiranje (Bethesda panel) ili imunohistokemija. MSI se genetskim testiranjem dokazuje PCR-om specifičnih mikrosatelitskih ponavljanja. Prisustvo nestabilnosti se dokazuje usporedbom dužine nukleotidnih ponavljanja kod tumorskih i normalnih stanica. Po korigiranom Bethesda panelu, upotrebljava se 5 mononukleotidnih markera koji se testiraju i analiziraju Promega sustavom analize.<sup>187</sup> Osim navedenog, dinukleotidni markeri su izbačeni iz analiza zbog slabije osjetljivosti i specifičnosti, dok su dodani pentanukleotidi koji osiguravaju da je uzorak tumora i kontrole od iste osobe. Najvažniji preduvjet točnih rezultata MSI je optimalna PCR kvaliteta. Prednost genetskog testiranja pred imunohistokemijom je slijedeća: određene mutacije mogu biti "missense" te neće utjecati na stabilnost i antigenost samog proteina, stoga imunohistokemijsko bojanje može biti očuvano unatoč nefunkcionalnom proteinu. Npr, slabo MLH1 bojanje uz odsutno PMS2 bojanje najčešće znači "missense" mutaciju MLH1. Genetska analiza može otkriti deficit MMR sustava koji nije uzrokovan klasičnim mutacijama gena MLH1, MSH2, MSH6 ili PMS2 i koji se neće moći zabilježiti prilikom imunohistokemije. Nedostaci genetskog testiranja proizlaze iz mogućnosti da se mutacije MSH6 gena neće moći klasificirati kao MSI-H zbog toga što njegovu funkciju može nadomjestiti MSH3 (koji također djeluje kao heterodimer sa MSH2) i stoga se tumori mogu lažno "niže" klasificirati kao MSS ili MSI-L.<sup>188,189</sup>



Monoklonska protutijela su u upotrebi od 1996 i omogućili su bržu i jeftiniju imunohistokemijsku detekciju MMR proteina pa se danas smatra da je imunohistokemija prva probirna metoda za dijagnozu MSI naspram genetskog testiranja. Imunohistokemija na samo dva proteina (MLH1/MSH2) ima osjetljivost od 85% u predikciji mutacija navedenih gena. To je nešto niže nego genetsko testiranje, čija osjetljivost seže do 93%. Međutim upotrebom sva 4 protutijela, osjetljivost imunohistokemije raste do 92%. Navedeno poboljšanje se većinom zasniva na mogućnosti da imunohistokemijsko bojanje na PMS2 može predvidjeti i propuštenu MLH1 mutaciju.<sup>190</sup> Osim toga, imunohistokemija na MSH6 ima puno veću osjetljivost nego genetsko testiranje. Ukupna specifičnost imunohistokemije je 95%.<sup>191</sup> Zaključno, imunohistokemija je pouzdana metoda za detekciju mutacija koje rezultiraju degradacijom proteina, međutim nije toliko pouzdana u prepoznavanju proteina koji rezultiraju “missense” mutacijama (morfološki uredan protein koji nema održanu funkciju). Većina MSH2 mutacija rezultiraju degradacijom proteina, pa je zato imunohistokemija pouzdana metoda.<sup>192</sup> Međutim, više od trećine MLH1 mutacija su “missense” i rezultiraju mutiranim proteinom koji je antigenski očuvan ali funkcionalno inaktivan.<sup>193</sup> Stoga imunohistokemija u ovom slučaju može biti lažno pozitivna. Kako je već navedeno ranije, u svom funkcionalnom stanju MMR protein formira heterodimere.<sup>194,195</sup> MSH2 dimerizira sa MSH6 i formira funkcionalni kompleks MutS, dok MLH1 dimerizira sa PMS2 i formira MutL. MSH2 i MLH1 su obligatorni partneri njihovih odgovarajućih heterodimera.<sup>196</sup> Njihova abnormalnost može rezultirati proteolitičkom degradacijom njihovog dimera i posljedičnim gubitkom i obligatornog i sekundarnog protein-partnera. Obrnuto međutim nije moguće. Kada se mutacija javi u genima sekundarnih protein (MSH6 ili PMS2), ne mora doći do istodobnog gubitka ekspresije obligatornih proteina (MSH2 i MLH1). Navedeno nastaje zato jer funkcija sekundarnih proteina može biti nadomještena drugim proteinima poput MSH3, MLH3 i PMS1. Zaključno, mutacija MLH1 ili MSH2 skoro uvijek uzrokuje gubitak imunohistokemijskog bojanja MLH1/PMS2 ili MSH2/MSH6, dok mutacije PMS2 i MSH6 uzrokuju izolirani gubitak samo navedenih proteina. Imunohistokemijskim bojanjem samo na MLH1/MSH2 nije moguće otkriti sve mutacije navedenih proteina, dok imunohistokemija na PMS2 i MSH6 ima kapacitet otkrivanja i vlastitih mutacija kao i onih na MLH1/MSH2.<sup>197</sup> Prednost imunohistokemije isto tako leži u tome što je lako dostupna i jeftinija (do 3x) od genetskog testiranja. Trenutno je patolog taj koji određuje da li, na osnovu morfologije tumora, ima smisla provoditi testiranje na MMR mutacije. U budućnosti će se najvjerojatnije provoditi rutinska testiranja kada će imunohistokemija biti na prvom mjestu, prije genetskog testiranja. U skoroj budućnosti predviđena je i daljnja redukcija rutinskog

imunohistokemijskog bojanja-ideja je da se radi isključivo bojanje na PMS2 I MSH6 (probir) radi gore navedenih razloga, a u slučaju patološkog nalaza uraditi dodatno i testiranje na MLH1 I MSH2. Ako je bojanje na PMS2 I MSH6 negativno, nema potrebe daljnjeg istraživanja. U odnosu na genetsko testiranje imunohistokemija također ima prednost jer, za razliku od određivanja MSI, može točno odrediti koji je MMR gen oštećen i time omogućiti ciljano genetsko testiranje. Isto tako prednost imunohistokemije je kod izoliranih mutacija MSH6 koje vrlo lako mogu promaći genetskom testiranju, ali će ih u tim slučajevima imunohistokemija uvijek prepoznati. Najvažniji nedostaci imunohistokemije su u tome što ne mora biti pouzdana kod malih bioptičkih uzoraka tkiva, međutim velike studije o navedenom još nisu provedene. Ipak u svakodnevnoj praksi najvažnije ograničanje imunohistokemije je kvaliteta bojanja<sup>198</sup> i to zbog tri situacije:

1. fokalno bojanje
2. nedostatak pozitivne unutarnje kontrole
3. citoplazmatsko bojanje

Fokalno i slabo bojanje uz nedostatak pozitivne unutarnje kontrole se najčešće susreće kod MLH1, a najvjerojatnije nastaje zbog mikrookruženja tumora (hipoksija?) te greške u fiksiranju tkiva, a ne zbog određenog tipa genetske mutacije. Fokalno i nejednako bojanje se najčešće susreće kod MSH6, ali je konkretni uzrok navedenog još nejasan. Izostanak pozitivne unutarnje kontrole, kod inače imunohistokemijski negativnih tumora, više nije razlog da se takvi preparati odbacuju kao neadekvatni. Detaljnim pregledom ili ponavljanim bojanjem se ipak može dokazati pozitivno bojanje okolnih benignih stanica dok su tumorske stanice negativne. Uloga i mjesto citoplazmatskog bojanja još nije poznata. Iako dakle postoje gore navedena ograničenja, adekvatna interpretacija imunohistokemije je poprilično lagana, pogotovo uz malo iskustva. Općenito, prisustvo nuklearnog bojanja tumorskih stanica (čak i ako je fokalno ili slabo) je dobar dokaz održanog MMR proteina. U rijetkim situacijama kada nema pozitivne unutarnje kontrole, sugerira se ponavljanje bojanja, a ako i ponovljeno bojanje ne verificira pozitivne stromalne stanice, tada je najbolje zaključiti da je tumor imunohistokemijski abnormalan ili inkonkluzivan.

MSI je opisana kod velikog broja tumora, najviše je istraživanja provedeno kod kolorektalnog karcinoma, a opisane su mutacije i kod karcinoma želuca, endometrija, jajnika te glioblastoma i limfoma.<sup>199</sup> Nasljedne mutacije MMR proteina su prvo opisane kod kolorektalnog karcinoma (KRK) u sklopu Lynch sindroma (ili hereditarnog ne-polipoznog kolorektalnog karcinoma-

HNPCC).<sup>200</sup> Lynch sindrom je autosomno dominantna bolest koja čini 2-3% svih kolorektalnih karcinoma,<sup>201</sup> a sveukupno (kod nositelja mutacija MMR proteina) povećava rizik KRK za 60-70% u muškaraca te 30-40% u žena, a za razvoj karcinoma endometrija 40-80%.<sup>202,203</sup> U sklopu Lynch sindroma češće su i druge metakrone neoplazme: tankog crijeva, uretera, bubrega, gušterače, bilijarnog trakta te CNS-a. KRK koji prezentiraju MSI imaju nekoliko karakteristika:

1. MSI je prisutna u otprilike 15% KRK-a koji su sporadični i uzrokovani hipermetilacijom MLH1
2. Otprilike 2-3% KRK-a su uzrokovani genetskim mutacijama u jednom od proteina MMR sustava
3. MSI fenotip je karakteriziran desnostranom lokacijom tumora, niskim patološkim stadijem, mucinoznom prezentacijom, limfocitima koji infiltriraju tumor, prisutnošću nodularnih infiltrata (slično kao kod Mb Crohn), odsutnošću nekroze te ranijom pojavom bolesti (<55 godina)
4. MSI tumori imaju bolju prognozu i smanjenu mogućnost metastaziranja naspram MSS tumora
5. Klasična kemoterapija bazirana na 5-fluorouracilu nema efekta kod MSI tumora tako da se kod njih naglasak daje na druge lijekove (irinotekan)
6. Novije studije imaju za cilj točnu karakterizaciju MSI tumora koja bi omogućila ciljanu terapiju

MSI fenotip je usko povezan s mutacijama onkogeni i tumor supresorskih gena, kao što su BRAF, KRAS te MRE11A. Većina KRK-a je karakterizirana nakupljanjem genetskih nestabilnosti poput delecije, translokacije i amplifikacije pa se navedeni tumori klasificiraju kao kromosomsko nestabilni (CIN-chromosomal instable).<sup>204</sup> S druge strane KRK-i koji nastaju mutacijama MMR gena imaju stabilan kariotip (kromosomsko stabilni-CIN negativni) te njihova genetska nestabilnost primarno nastaje zbog varijacija u mikrosatelitima. Mutacije više od 30 gena nastaju iz mikrosatelita zbog oštećenog MMR sustava, a ti geni su uključeni u niz staničnih funkcija i puteva (proteini DNA popravka-MRE 11A, HRAD50; čimbenici rasta TGF beta receptor II, IGF receptor II; proapoptični factor BAX).<sup>205</sup> MSI tumori su usko povezani i s mutacijama gena koji kodiraju kinaze zbog čega su vrlo pogodni za moguće terapijske ciljeve: BRAF mutacija u KRK-u je puno češće u sporadičnim slučajevima

(hipermetilacija MLH1) nego u nasljednim dok je KRAS mutacija je rjeđa kod MSI nego MSS tumora.<sup>206</sup>

Naziv HNPCC (nasljedni nepolipozni KRK) je ipak zbunjujući jer se i kod HNPCC (Lynch sindrom) vrlo često verificiraju adenomi debelog crijeva.<sup>207</sup> Ipak prisustvo više od 10-15 adenoma je vrlo rijetko i prije ukazuje na mogući atenuirani oblik familijarne polipoze.<sup>208</sup> Analiza adenoma u sklopu Lynch sindroma ukazuje na to da u sklopu velikog broja adenoma (60-90%) postoji deficit MMR proteina i da je brzina prelaska adenoma u karcinom puno kraća (2-3 godine) nego kod sporadičnog KRK (6-8 godina)<sup>209</sup> te da su adenoma u Lynch sindromu češće "flat" nego pedunkularni. Ipak ovakvi pacijenti imaju bolje preživljenje te niži rizik od metastaza nego kod sporadičnog KRK-a, najvjerojatnije zbog dva mehanizma:

1. Povećan broj citotoksičnih CD8 T-limfocita unutar adenoma i tumora
2. Snižena razina transkripcije unutar tumora koja je odgovorna za lokalno širenje i udaljene metastaze

Smjernice brojnih svjetskih gastroenteroloških društava i dalje su u nesuglasju što se tiče praćenja i potrebe terapije BE prije razvoja adenokarcinoma. Strategija čestih kontrolnih endoskopija i biopsija se nije pokazala „cost-effective“, dok brojnim studijama i dalje nije verificiran biomarker (osim displazije koja se dijagnosticira patohistološki) koji bi bio pogodan za praćenje i odluku o ranoj terapiji. Po dostupnim literaturnim podacima (Pubmed) ispitivanje ekspresije proteina imunohistokemijskom metodom (te na osnovu rezultata analize postojanje ili nepostojanje MSI) nije u ovom obliku provedeno kod pacijenata sa BE. U literaturi postoje 4 rada u kojima je ispitivana mikrosatelitska nestabilnost kod pacijenata sa adenokarcinomom jednjaka, ali su navedena istraživanja ograničena malim brojem pacijenata i primarno usporedbom MSI kod adeno i planocelularnog karcinoma<sup>210</sup> te ispitivanjem MSI isključivo kod adenokarcinoma.<sup>211-213</sup> S obzirom na isti patofiziološki mehanizam razvoja adenokarcinoma jednjaka (slijed metaplazija-displazija-karcinom) kao i karcinoma debelog crijeva gdje je MSI dokazani rizični čimbenik, smatramo da bi određivanje ekspresije MLH1, MSH2, PMS2 i MSH6 u različitim fazama BE moglo dovesti do podataka o vrijednosti ovih čimbenika kao prognostičkih faktora koji bi mogli utjecati na prepoznavanje pacijenata koji su povišenim rizikom te kod kojih bi se odlučili na raniju endoskopsku terapiju i češće kontrole.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. odrediti ekspresiju MLH1 (pozitivna/negativna), MSH2 (pozitivna/negativna), PMS2 (pozitivna/negativna), MSH6 (pozitivna/negativna) i p53 (pozitivna/negativna) na reprezentativnom uzorku pacijenata sa BE u različitim fazama bolesti (intestinalna metaplazija, displazija niskog i visokog stupnja, adenokarcinom)
2. usporediti ekspresiju MLH1 sa ekspresijom MSH2
3. uraditi komparativnu analizu ekspresije MLH1 i PMS2
4. uraditi komparativnu analizu ekspresije MSH2 i MSH6
5. usporediti ekspresiju MLH1, MSH2, PMS2 te MSH6 sa ekspresijom p53
6. usporediti ekspresiju MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 i p53 pojedinačno u različitim fazama razvoja BE od metaplazije prema adenokarcinomu
7. Utvrditi korelaciju ekspresije MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 i p53 u uzorcima te na osnovi statističke analize zaključiti o mogućoj ulozi određivanja navedenih biomarkera kao prognostičkih čimbenika u razvoja karcinoma jednjaka te prepoznavanju one skupine bolesnika koja će imati koristi od ranijeg i agresivnijeg liječenja.

Osnovna hipoteze istraživanja jest da se napredovanjem (pogoršanjem histologije) BE javljaju češće mutacije u MMR sustavu to jest veći gubitak imunohistokemijske ekspresije MMR proteina. Sekundarne hipoteze su da se u različitim stadijima BE prati podjednaka ekspresija heterodimera (MLH1/PMS2 te MSH2/MSH6) te da ekspresija p53 proteina prati gubitak ekspresije MMR proteina u različitim stadijima bolesti.

## 3. USTROJ ISTRAŽIVANJA

Riječ je o retrospektivnom istraživanju (povijesna kohortna studija). U odnosu na pristup istraživanje je eksperimentalno, a s obzirom na namjenu primijenjeno. Prema specifičnom ustroju radi se o presječnom istraživanju (cross-sectional study). Prema načinu dobivanja podataka istraživanje je opservacijsko.

## 4. ISHOD ISTRAŽIVANJA

Ishod istraživanja je određivanje razlike u ekspresiji p53, MLH1 i MSH2, PMS2 te MSH6 u uzorcima tkiva (bioptički uzorci distalnog jednjaka dobiveni tokom endoskopske pretrage gornje probavne cijevi i kirurški materijal) različitih faza razvoja BE-intestinalna metaplazija-

displazija niskog i visokog stupnja-adenokarcinom jednjaka (glavni izlazni parametar). Sporedni izlazni parametri je komparativna analiza ekspresije MLH1/PMS 2 i MSH2/MSH6.

## 5. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

U istraživanju su korišteni arhivirani parafinski blokovi bioptičkih uzoraka sluznice BE uzetih po Seattle protokolu (biopsije iz 4 kvadranta sluznice BE na svako 1-2 cm) te intraoperativnih resekcijskih materijala tokom dvije godine (2009. i 2010.) uzastopno dijagnosticiranih bolesnika sa BE i adenokarcinomom jednjaka. Za istraživanje su korišteni materijali bolesnika sa BE (intestinalna metaplazija, displazija niskog i visokog stupnja) te adenokarcinomom jednjaka. S obzirom da je u skupini sa displazijom visokog stupnja bilo malo pacijenata (3), dogovorno je statistička obrada urađena u tri skupine: BE bez displazije, BE sa displazijom (niskog i visokog stupnja) te adenokarcinom jednjaka. U studiju je sveukupno uključeno 70 pacijenata i važno je naglasiti da su svi pacijenti različiti, dakle nisu korišteni parafinski blokovi istog pacijenta sa eventualnom drugačijom patohistološkom analizom (npr intraoperativni resekcijski materijal adenokarcinoma koji je na jednom dijelu uzorka pokazivao displaziju). Isključni kriteriji su bili planocelularni karcinom jednjaka, bolesnici sa nepotpunim podacima, uzorci koji nisu dobiveni gore navedenim metodama te oni koji nisu adekvatno patohistološki potvrđeni iako postoji endoskopski sumnja na BE.

Klasifikacija displazije je histološki određena prema revidiranoj Bečkoj klasifikaciji (intestinalna metaplazija-bez displazije te displazija niskog i visokog stupnja), potvrđena od dva nezavisna patologa. Od parafinskih blokova su napravljeni dodatni rezovi na silanizirana stakla radi imunohistokemijskog bojenja standardnom imunohistokemijskom metodom (imunoperoksidaza avidin-biotin) koristeći protutijela anti-p53 (Dako, Danska), anti-MLH1, anti-MSH2, anti PMS2 i anti MSH6 (sva protutijela proizvođača Novocastra, Engleska) strojem za automatsko bojanje (Autostainer, Dako, Danska). Vrijednost ekspresije p53, MLH1, MSH2, PMS2 i MLH6 je određena semikvantitativnim metodom (negativna i pozitivna). Pozitivno bojanje je definirano kao kompletno nuklearno bojanje displastičnih i tumorskih stanica (epitelna komponenta tumora). Tumorske i displastične stanice sa kompletnim gubitkom nuklearnog bojanja, a uz prisustvo bojanja normalnih epitelnih ili upalnih (limfatičnih) stanica su definirane kao negativne (gubitak proteina dokazan imunohistokemijskim bojanjem). Bojanje je dakle nuklearno a pozitivna unutarnja kontrola je nuklearno bojanje normalnih epitelnih i stromalnih stanica te limfocita. Stoga je klasifikacija pozitivna i negativna (MLH1 pozitivan ili negativan, MSH2 pozitivan ili negativan, PMS2 pozitivan ili negativan te MSH6 pozitivan ili negativan). Ekspresija p53 je klasificirana kao

pozitivna (bojanje u više od 10% stanica) te negativna (bojanje u manje od 10% stanica)-također je riječ o nuklearnom bojanju. Vrijednosti ekspresije p53, MLH1, MSH2, PMS2 te MSH6 uspoređene su unutar istraživanih skupina bolesti.

Razina statističke značajnosti određena je na 5% ( $P=0,05$ ) te su svi intervali pouzdanosti dani na razini 5%. U svim slučajevima upotrebljavani su dvokračni testovi statističke značajnosti. Egzaktni i Monte Carlo testovi statističke značajnosti korišteni su umjesto asimptotskih. Normalnost distribucija kvalitativnih varijabli provjerena je Shapiro-Wilks testom u slučaju uzorka manjeg od 30 ili Kolmogorov Smirnov testom u slučaju uzorka većeg od 30. Kao mjere centralne tendencije prikazani su aritmetička sredina i standardna devijacija u slučaju normalne distribucije, odnosno medijan i interkvartilno raspršenje u slučaju statistički značajnog odstupanja od normalne distribucije. Povezanost dvije varijabli s više od dvije kategorije, kao što je razlika u pojavi mutacije proteina između tri faze Barrettovog jednjaka, analizirana je hi-kvadrat testom, uz koji je kod statistički značajnih rezultata kao standardizirana mjera veličine učinka dan koeficijent kontingencije C. Statistički značajna povezanost dvije binarne varijable, primjerice razlika u mutaciji jednog proteina s obzirom na mutaciju drugog, analizirana je Fisherovim Egzaktnim testom, te Phi koeficijentom korelacije, koji je ujedno i standardizirana mjera veličine učinka za Fisherov Egzaktni test.

Za testiranje razlika između više od dvije skupine na kontinuiranoj varijabli, kao što su razlike u stupnju ekspresije proteina s obzirom na tri faze bolesti, korišten je Kruskal-Wallis test sa kvadriranim eta koeficijentom ( $\eta^2$ ) kao standardiziranom mjerom učinka. Za međusobne usporedbe dvije po dvije grupe korišten je Mann-Whitney U test, uz Bonferronijevu korekciju razine statističke značajnosti. Povezanosti stupnja ekspresije proteina analizirane su Spearmanovim rho koeficijentom korelacije. Sve statističke obrade obavljene su u paketu SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 6. REZULTATI

Osnovni demografski podaci pacijenata prikazani su u tablicama 1. i 2.

**Tablica 1.** Uzorak prema spolu, dobi i skupini BE (metaplazija, displazija, adenokarcinom)

	N	(%)
Spol		
muški	52	(74,3)
ženski	18	(25,7)
ukupno	70	(100,0)
Dob (ar.sr, st.dev)	63,2	(10,77)
Barrett bez displazije	22	(31,4)
Barrett s displazijom	37	(52,9)
Adenokarcinom	11	(15,7)
Ukupno	70	(100,0)

KRATICE: ar.sr = aritmetička sredina; st.dev = standardna devijacija

Budući da je u skupini visokog stupnja displazije bilo premalo sudionika za valjanu statističku analizu (n=3), skupina s visokim i niskim stupnjem displazije spojene su u jednu skupinu, "s displazijom", te je takva kategorizacija korištena u svim daljnjim analizama.

Distribucija dobi sudionika nije statistički značajno odstupala od normalne niti u jednoj od tri ispitivane skupine (Kolmogorov - Smirnov  $z = 0,078$ ;  $P = 0,200$ ), pa su zato aritmetička sredina i standardna devijacija korišteni kao mjere centralne tendencije i raspršenja.



**Tablica 2. Spolne i dobne razlike s obzirom na tri faze bolesti**

	Faza Barrettovog jednjaka						P; učinak
	Bez displazije		S displazijom		Adenokarcinom		
	n	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Spol</b>							
muški	15	(68,2)	28	(75,7)	9	(81,8)	0,706
ženski	7	(31,8)	9	(24,3)	2	(18,2)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	
Dob (ar.sr; st.dev)	58,5	(10,69)	65,8	(10,96)	64,3	(7,27)	<b>0,036; 0,094</b>

KRATICE: ar.sr = aritmetička sredina; st.dev = standardna devijacija; P =  $\chi^2$  test za nominalne varijable, ANOVA za kontinuirane varijable; razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); učinak = standardizirana mjera učinka dana uz statistički značajne rezultate;  $\eta^2$  za ANOVA

Utvrđena je statistički značajna razlika u dobi između tri skupine sudionika (ANOVA, F = 3,489; ss = 2; P = 0,036;  $\eta^2$  = 0,094). Najmlađi sudionici bili su u skupini bez displazije, dok su najstariji sudionici bili u skupini s displazijom. Provedenim Bonferronijevim post-hoc testom pokazalo se kako se statistički značajno razlikuju samo skupina bez displazije i skupina s displazijom (P = 0,033).

Odnosi ekspresije proteina prema spolu i dobi prikazani su u tablicama 3. i 4.

**Tablica 3. Spolne razlike s obzirom na mutacije proteina**

	Spol				P
	Muški		Ženski		
	n	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	23	(44,2)	9	(50,0)	0,672
bez mutacije	29	(55,8)	9	(50,0)	
ukupno	52	(100,0)	18	(100,0)	

**MSH2**

mutacija	3	(5,8)	1	(5,6)	0,973
bez mutacije	49	(94,2)	17	(94,4)	
ukupno	52	(100,0)	18	(100,0)	

#### PMS2

mutacija	25	(48,1)	9	(50,0)	0,88
bez mutacije	27	(51,9)	9	(50,0)	
ukupno	52	(100,0)	18	(100,0)	

#### MSH6

mutacija	3	(5,8)	1	(5,6)	0,973
bez mutacije	49	(94,2)	17	(94,4)	
ukupno	52	(100,0)	18	(100,0)	

#### p53

negativno	8	(15,4)	2	(11,1)	0,655
pozitivno	44	(84,6)	16	(88,9)	
ukupno	52	(100,0)	18	(100,0)	

---

KRATICE:  $P = \chi^2$  test za nominalne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Ovom analizom nije utvrđena statistički značajna veza između spola i ekspresije pojedinih ispitivanih gena.

**Tablica 4.** Dobne razlike s obzirom na mutacije proteina

	N	K-S/ S - W P	median	(IQR)	P
<b>MLH1</b>					
mutacija	32	0,200	63,5	(58,3-72)	0,946
bez mutacije	38	<b>0,040</b>	65,5	(52,3-72,3)	
<b>MSH2</b>					
mutacija	4	0,956	59,5	(37,8-76,8)	0,615
bez mutacije	66	0,094	65	(54-72,3)	
<b>PMS2</b>					
mutacija	34	0,200	63,5	(57-70)	0,721
bez mutacije	36	<b>0,035</b>	65,5	(53,3-73,5)	
<b>MSH6</b>					
mutacija	4	0,956	59,5	(37,8-76,8)	0,626
bez mutacije	66	0,094	65	(54-72,3)	
<b>p53</b>					
negativno	10	0,079	61	(57,3-74,3)	0,888
pozitivno	60	0,200	65	(54-70,5)	

KRATICE: K-S/S-W P = Kolmogorov-Smirnov test normalnosti distribucije za uzorke veće od 30 ili Shapiro - Wilk test normalnosti distribucije za uzorke manje od 30, razina statističke značajnosti; IQR = interkvartilni raspon; P = Mann - Whitney U test razlika između dvije skupine na kontinuiranoj varijabli; razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna dobna razlika s obzirom na ekspresiju pojedinih gena.

Ekspresije MLH 1, MSH 2, PMS 2, MSH 6 i p53 proteina u tri faze bolesti prikazane su u tablici 5.

**Tablica 5.** Razlike u mutaciji proteina s obzirom na tri faze bolesti

	Faza Barrettovog jednjaka						P; učinak
	Bez displazije		S displazijom		Adenokarcinom		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>							
mutacija	11	(50,0)	12	(32,4)	9	(81,8)	<b>0,014; 0,330</b>
bez mutacije	11	(50,0)	25	(67,6)	2	(18,2)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	
<b>MSH2</b>							
mutacija	4	(18,2)	0	(0,0)	0	(0,0)	<b>0,019; 0,342</b>
bez mutacije	18	(81,8)	37	(100,0)	11	(100,0)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	
<b>PMS2</b>							
mutacija	12	(54,5)	13	(35,1)	9	(81,8)	<b>0,019; 0,318</b>
bez mutacije	10	(45,5)	24	(64,9)	2	(18,2)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	
<b>MSH6</b>							
mutacija	4	(18,2)	0	(0,0)	0	(0,0)	<b>0,018; 0,342</b>
bez mutacije	18	(81,8)	37	(100,0)	11	(100,0)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	
<b>p53</b>							
negativno	3	(13,6)	5	(13,5)	2	(18,2)	>0,999
pozitivno	19	(86,4)	32	(86,5)	9	(81,8)	
ukupno	22	(100,0)	37	(100,0)	11	(100,0)	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test za nominalne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); učinak = standardizirana mjera veličine učinka dana uz statistički značajne rezultate, koeficijent kontigencije C za  $\chi^2$  test

Utvrđena je statistički značajna razlika u ekspresiji MLH 1 između tri faze Barrettovog jednjaka ( $\chi^2 = 8,571$ ; ss= 2; P = 0,014, koeficijent kontigencije = 0,330). Mutacija MLH 1 bila

je prisutna kod 81,8% (9/11) sudionika s adenokarcinomom, zatim 32,64% (12/37) sudionika s displazijom i 50% (11/22) sudionika bez displazije. Statistički značajna razlika utvrđena je i u ekspresiji MSH 2 ( $\chi^2 = 9,256$ ; ss= 2; P = 0,019, koeficijent kontigencije = 0,342). Niti jedan sudionik s displazijom, kao niti s adenokarcinomom nije imao prisutnu mutaciju MSH 2, u odnosu na 18,2% (4/22) sudionika bez displazije. Razlika u ekspresiji PMS 2 između tri faze Barrettovog jednjaka također se pokazala statistički značajnom ( $\chi^2 = 7,856$ ; ss= 2; P = 0,019, koeficijent kontigencije = 0,318), te je kod sudionika s adenokarcinomom mutacija najčešće bila prisutna, kod njih 81,8% (9/11), zatim kod 54,5% (10/22) sudionika bez displazije i 35,1% (13/37) sudionika s displazijom. Niti jedan od sudionika iz skupine s displazijom, kao niti iz skupine s adenokarcinomom nije imao prisutnu mutaciju MSH 6, u odnosu na 18,2% (4/22) sudionika iz skupine bez displazije, te se ta razlika također pokazala statistički značajnom ( $\chi^2 = 9,256$ ; ss= 2; P = 0,018, koeficijent kontigencije = 0,342).

Međusobna usporedba ekspresije ispitivanih proteina je prikazana u slijedećim tablicama.

### **Usporedba MLH 1 i PMS 2 proteina**

**Tablica 6.** Povezanost MLH 1 i PMS 2 proteina

	N	Spearman rho	P
cijeli uzorak	70	0,970	<0,001
bez displazije	22	0,952	<0,001
Displazija	37	0,964	<0,001
Adenokarcinom	11	1,000	

KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nakon analize povezanosti PMS 2 i MLH 1 proteina na kontinuiranim vrijednostima, utvrđena je snažna statistički značajna, pozitivna korelacija između MLH 1 i PMS 2 proteina, kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina. U sva četiri slučaja korelacija je pozitivna, što ukazuje na to da s porastom vrijednosti MLH 1 proteina, rastu i vrijednosti PMS 2 proteina. U skupini sudionika s adenokarcinomom koeficijent korelacije iznosi 1, što ukazuje na to da, u toj skupini, ta dva parametra u potpunosti slijede jedan drugog.

*Cijeli uzorak*

**Tablica 7.** Razlika u mutaciji PMS 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH1 proteina

	PMS 2				P, $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	n	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	32	(94,1)	0	(0,0)	<0,001; 0,944
bez mutacije	2	(5,9)	36	(100,0)	
ukupno	34	(100,0)	36	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i PMS 2 proteina (Fisherov Egzaktni test;  $P > 0,001$ , Phi koeficijent = 0,994). Phi koeficijent korelacije izrazito je visok, te ukazuje na snažnu pozitivnu povezanost ekspresije ta dva proteina. Kod gotovo svih sudionika s mutacijom PMS 2 javila se i mutacija MLH 1, odnosno kod njih 94,1% (32/34).

*Bez displazije*

**Tablica 8.** Razlika u mutaciji PMS 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH1 proteina kod sudionika bez displazije Barrettovog jednjaka

	PMS 2				P, $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	n	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	11	(91,7)	0	(0,0)	<0,001; 0,913
bez mutacije	1	(8,3)	10	(100,0)	
ukupno	12	(100,0)	10	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Kod sudionika iz skupine bez displazije je utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i PMS 2 proteina (Fisherov Egzaktni test;  $P > 0,001$ , Phi koeficijent = 0,913). Phi koeficijent korelacije izrazito je visok, te ukazuje na snažnu pozitivnu povezanost ekspresije ta dva proteina. Kod gotovo svih sudionika s mutacijom PMS 2 javila se i mutacija MLH 1, odnosno kod njih 91,7% (11/12).

#### *S displazijom*

**Tablica 9.** Razlika u mutaciji PMS 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH1 proteina kod sudionika s displazijom Barrettovog jednjaka

	PMS 2				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	n	(%)	N	(%)	
MLH1					<b>&lt;0,001; 0,941</b>
mutacija	12	(92,3)	0	(0,0)	
bez mutacije	1	(7,7)	24	(100,0)	
ukupno	13	(100,0)	24	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i PMS 2 proteina kod skupine sudionika s displazijom (Fisherov Egzaktni test;  $P < 0,001$ ; Phi koeficijent= 0,941). Među sudionicima koji su imali mutaciju PMS 2 proteina, kod njih 92,3% (12/13) utvrđena je i mutacija MLH1 proteina.

**Tablica 10.** Razlika u mutaciji PMS 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH1 proteina kod sudionika s adenokarcinomom

	PMS 2				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	n	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	9	(100,0)	0	(0,0)	<b>0,018; 1,000</b>
bez mutacije	0	(0,0)	2	(100,0)	
ukupno	9	(100,0)	2	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i PMS 2 proteina kod skupine sudionika s adenokarcinomom (Fisherov Egzakt test; P =0,018; Phi koeficijent > 0,999). Među sudionicima koji su imali mutaciju PMS 2 proteina, svi su imali i mutaciju MLH 1 proteina.

### Usporedba MSH 2 i MSH 6 proteina

**Tablica 11.** Povezanost MSH 2 i MSH 6 proteina

	N	Spearman rho	P
cijeli uzorak	70	<b>0,907</b>	<b>&lt;0,001</b>
bez displazije	22	<b>0,955</b>	<b>&lt;0,001</b>
Displazija	37	<b>0,892</b>	<b>&lt;0,001</b>
Adenokarcinom	11	<b>0,831</b>	<b>0,002</b>

KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nakon analize povezanosti MSH 2 i MSH 6 proteina na kontinuiranim vrijednostima, utvrđena je snažna statistički značajna, pozitivna korelacija između MSH 2 i MSH 6 proteina,



kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina. U sva četiri slučaja korelacija je pozitivna, što ukazuje na to da s porastom vrijednosti MSH 2 proteina, rastu i vrijednosti MSH 6 proteina.

#### *Cijeli uzorak*

**Tablica 12.** Razlika u mutaciji MSH 6 proteina s obzirom na mutaciju MSH 2 proteina

	MSH 6				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	N	(%)	N	(%)	
<b>MSH 2</b>					
mutacija	4	(100,0)	0	(0,0)	<b>&lt;0,001; 1,000</b>
bez mutacije	0	(0,0)	66	(100,0)	
ukupno	4	(100,0)	66	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MSH 6 i MSH 2 proteina (Fisherov Egzaktni test; P <0,001; Phi koeficijent >0,999). Svi sudionici koji su imali mutaciju MSH 6 proteina, imali su i mutaciju MSH 2 proteina.

#### *Bez displazije*

**Tablica 13.** Razlika u mutaciji MSH 6 proteina s obzirom na mutaciju MSH 2 proteina kod sudionika bez displazije Barrettovog jednjaka

	MSH 6				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	N	(%)	N	(%)	

MSH 2					
mutacija	4	(100,0)	0	(0,0)	<0,001; 1,000
bez mutacije	0	(0,0)	18	(100,0)	
ukupno	4	(100,0)	18	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Kod sudionika iz skupine bez displazije je utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije MSH 6 i MSH 2 proteina (Fisherov Egzaktni test;  $P > 0,001$ , Phi koeficijent  $> 0,999$ ). Svi sudionici koji su imali mutaciju MSH 6 proteina, imali su i mutaciju MSH 2 proteina.

Nitko od sudionika iz skupine s displazijom, kao niti iz skupine s adenokarcinomom nije imao mutaciju MSH 6, niti MSH 2 proteina.

#### Usporedba MLH 1 i MSH 2 proteina

*Cijeli uzorak*

**Tablica 14.** Razlika u mutaciji MSH 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH 1 proteina

	MSH 2				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	N	(%)	N	(%)	
MLH 1					
mutacija	2	(50,0)	30	(45,5)	>0,999; 0,021
bez mutacije	2	(50,0)	36	(54,5)	
ukupno	4	(100,0)	66	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Nije utvrđena statistički značajna povezanost mutacije MSH 2 i MLH 1 proteina

### Bez displazije

**Tablica 15.** Razlika u mutaciji MSH 2 proteina s obzirom na mutaciju MLH 1 proteina kod sudionika bez displazije Barrettovog jednjaka

	MSH 2				P; $\phi$
	Mutacija		bez mutacije		
	N	(%)	N	(%)	
MLH 1					
mutacija	2	(50,0)	9	(50,0)	>0,999; 0,000
bez mutacije	2	(50,0)	9	(50,0)	
ukupno	4	(100,0)	18	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Nije utvrđena statistički značajna povezanost mutacije MSH 2 i MLH 1 proteina kod sudionika bez displazije Barrettovog jednjaka.

Budući da nitko od sudionika iz skupine s displazijom i iz skupine s adenokarcinomom nije imao mutaciju na MSH 2 proteinu, obradu nije bilo moguće izvršiti.

### **Usporedba MLH1, PMS2, MSH 2 i MSH 6 proteina s p53 proteinom**

#### *Cijeli uzorak*

**Tablica 16.** Razlika u mutaciji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 proteina

	p53				P, $\phi$
	Negativno		pozitivno		
	N	(%)	N	(%)	
MLH1					
mutacija	8	(80,0)	24	(40,0)	0,036; 0,281

bez mutacije	2	(20,0)	36	(60,0)	
ukupno	10	(100,0)	60	(100,0)	
PMS 2					
mutacija	8	(80,0)	26	(43,3)	0,043, 0,257
bez mutacije	2	(20,0)	34	(56,7)	
ukupno	10	(100,0)	60	(100,0)	
MSH 2					
mutacija	0	(0,0)	4	(6,7)	>0,999; -0,101
bez mutacije	10	(100,0)	56	(93,3)	
ukupno	10	(100,0)	60	(100,0)	
MSH 6					
mutacija	0	(0,0)	4	(6,7)	>0,999; -0,101
bez mutacije	10	(100,0)	56	(93,3)	
ukupno	10	(100,0)	60	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzaktni test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i p53 proteina (Fisherov Egzaktni test; P = 0,036; Phi koeficijent = 0,281), te PMS 2 i p53 proteina (Fisherov Egzaktni test; P = 0,043; Phi koeficijent = 0,257). Sudionici koji su imali pozitivan nalaz, odnosno ekspresiju p53 češće su bili bez mutacije MLH 1 i PMS 2 proteina, dok su sudionici bez ekspresije p53 češće imali mutaciju MLH 1 i PMS 2 proteina.

**Tablica 17.** Povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53

	N	Spearman rho	P
MLH 1	70	0,095	0,436
PMS 2	70	0,100	0,410
MSH 2	70	0,204	0,090
MSH 6	70	0,241	0,045

KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nakon što je analizirana povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s p53 proteinom na kontinuiranim, nekodiranim vrijednostima, utvrđena je statistički značajna, pozitivna korelacija MSH 6 i p53 proteina (Spearman rho=0,241, 0,045).

*Bez displazije*

**Tablica 18.** Razlika u mutaciji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 proteina kod sudionika bez displazije

	p53				P, $\phi$
	Negativno		pozitivno		
	N	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	2	(66,7)	9	(47,4)	>0,999; 0,132
bez mutacije	1	(33,3)	10	(52,6)	
ukupno	3	(100,0)	19	(100,0)	
<b>PMS 2</b>					
mutacija	2	(66,7)	10	(52,6)	>0,999; 0,097
bez mutacije	1	(33,3)	9	(47,4)	
ukupno	3	(100,0)	19	(100,0)	
<b>MSH 2</b>					
mutacija	0	(0,0)	4	(21,1)	>0,999; -0,187
bez mutacije	3	(100,0)	15	(78,9)	
ukupno	3	(100,0)	19	(100,0)	
<b>MSH 6</b>					
mutacija	0	(0,0)	4	(21,1)	>0,999; -0,187
bez mutacije	3	(100,0)	15	(78,9)	
ukupno	3	(100,0)	19	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 kod sudionika bez displazije.

**Tablica 19.** Povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika bez displazije

	n	Spearman rho	P
MLH 1	22	0,274	0,218
PMS 2	22	0,325	0,140
MSH 2	22	0,246	0,271
MSH 6	22	0,229	0,304

KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika bez displazije.

#### *S displazijom*

**Tablica 20.** Razlika u mutaciji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 proteina kod sudionika s displazijom

	p53				P, $\phi$
	Negativno		pozitivno		
	N	(%)	N	(%)	
<b>MLH1</b>					
mutacija	4	(80,0)	8	(25,0)	<b>0,030; 0,402</b>
bez mutacije	1	(20,0)	24	(75,0)	
ukupno	5	(100,0)	32	(100,0)	
<b>PMS 2</b>					
mutacija	4	(80,0)	9	(28,1)	<b>0,042; 0,371</b>
bez mutacije	1	(20,0)	23	(71,9)	
ukupno	5	(100,0)	32	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH 1 i p53 proteina (Fisherov Egzakt test; P = 0,030; Phi koeficijent = 0,402), te PMS 2 i p53 proteina (Fisherov Egzakt test; P = 0,042; Phi koeficijent = 0,371) kod sudionika sa displazijom. Sudionici koji su imali pozitivan nalaz, odnosno ekspresiju p53 češće su bili bez mutacije MLH 1 i PMS 2 proteina, dok su sudionici bez ekspresije p53 češće imali mutaciju MLH 1 i PMS 2 proteina. Budući da nitko od sudionika s displazijom nije imao mutacije na MSH 2 i MSH 6 proteinima, tu obradu nije bilo moguće izvršiti.

**Tablica 21.** Povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika s displazijom

	n	Spearman rho	P
MLH 1	37	0,174	0,304
PMS 2	37	0,159	0,348
MSH 2	37	0,186	0,270
MSH 6	37	0,196	0,246

KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika s displazijom.

#### *Adenokarcinom*

**Tablica 22.** Razlika u mutaciji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 proteina kod sudionika s adenokarcinomom

	P 53				
	Negativno		pozitivno		P; $\phi$
	n	(%)	N	(%)	

MLH1

mutacija	2	(100,0)	7	(77,8)	>0,999; 0,222
bez mutacije	0	(0,0)	2	(22,2)	
ukupno	2	(100,0)	9	(100,0)	

PMS 2

mutacija	2	(100,0)	7	(77,8)	>0,999; 0,222
bez mutacije	0	(0,0)	2	(22,2)	
ukupno	2	(100,0)	9	(100,0)	

KRATICE: P = Fisherov Egzakt test za dihotomne varijable, razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\phi$  = Phi koeficijent korelacije za dihotomne varijable; standardizirana mjera veličine učinka, uz Fisher Exact test

Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 kod sudionika s adenokarcinomom.

Budući da nitko od sudionika s adenokarcinomom nije imao mutacije na MSH 2 i MSH 6 proteinima, tu obradu nije bilo moguće izvršiti.

**Tablica 23.** Povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika s adenokarcinomom

	n	Spearman rho	P
MLH 1	11	-0,244	0,469
PMS 2	11	-0,244	0,469
MSH 2	11	-0,269	0,423
MSH 6	11	0,051	0,883

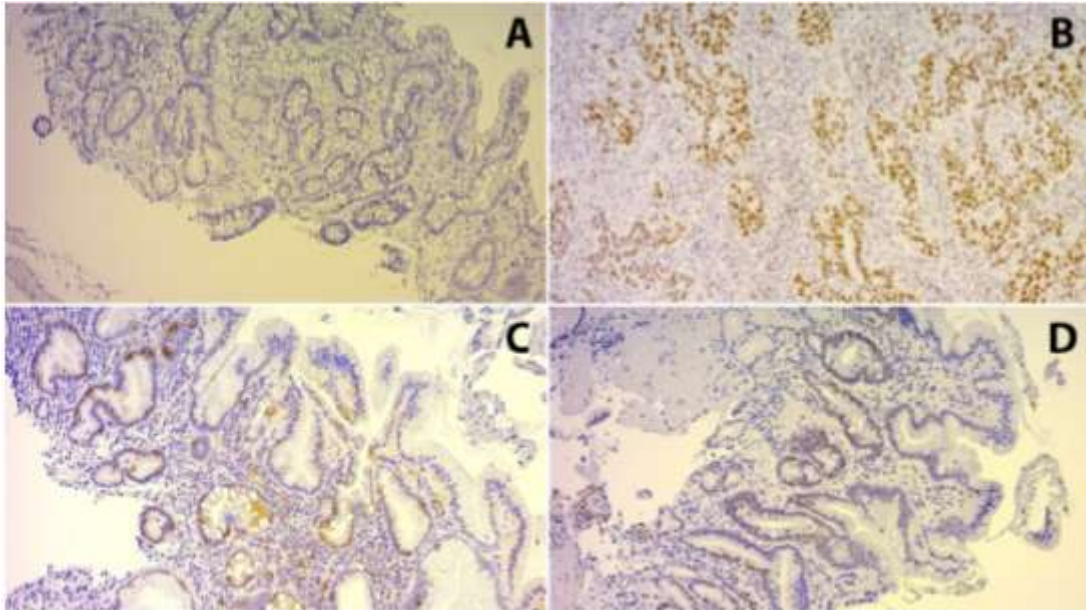
KRATICE: P = razina statističke značajnosti, odnosno vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna povezanost MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s proteinom p53 kod sudionika s adenokarcinomom.



Slika 1 prikazuje imunohistokemijsku ekspresiju mikrosatelitske nestabilnosti u različitim fazama Barrett jednjaka

- A gubitak MLH1 ekspresije kod BE bez displazije
- B pozitivna MSH2 ekspresija kod karcinoma jednjaka
- C gubitak MLH1 ekspresije kod BE sa displazijom niskog stupnja
- D pozitivna MLH1 ekspresija kod BE bez displazije



## 7. RASPRAVA

Kao što je već detaljno obrazloženo u uvodu Barrett-ov jednjak predstavlja jedan od najvećih rizika za razvoj adenokarcinoma jednjaka koji nastaje akumulacijom brojnih mutacija distalnog jednjaka koji dovode do progresije bolesti iz faze BE bez displazije potom displastičnog epitela te u konačnici adenokarcinoma. S obzirom na to da su tehnike liječenja BE poprilično skupe a ukupni rizik od razvoja adenokarcinoma kod većine pacijenata je nizak, liječenje svih pacijenata sa BE nije potrebno. Važno je prepoznati onu populaciju pacijenata koja i u fazi ne-displastičnog epitela ima povišen rizik od razvoja adenokarcinoma. U tom smislu se upotrebljava široka paleta biomarkera koji bi trebali prepoznati pacijente s visokim rizikom od razvoja karcinoma, što bi omogućilo ranije liječenje tih bolesnika. Većina biomarkera je izrazito skupa i trenutno se može upotrebljavati isključivo u eksperimentalne i istraživačke svrhe, a ne u rutinskoj kliničkoj praksi. Također za veliki broj istraživanih biomarkera podaci su nekonzistentni, stoga se i dalje u kliničkoj praksi, kao jedini pravi biomarker, upotrebljava patohistološki dokazana displazija epitela.

Ideja ovoga doktorata je bila testirati relativno jeftine i lako dostupne biomarkere mikrosatelitske nestabilnosti koji su dobro istraženi u razvoju kolorektalnog karcinoma. S obzirom na to da je biologija nastanka kolorektalnog karcinoma slična kao i adenokarcinoma jednjaka (LGD-HGD-karcinom), logična premisa jest da bi navedeni biomarkeri bili korisni i u praćenju pacijenata sa BE i da bi mogli biti faktor koji odlučuje o početku terapije (najčešće endoskopske).

Osnovni demografski podaci naše populacije pacijenata se ne razlikuju od onih u općoj zapadnoeuropskoj populaciji. Ukupno je uključeno 70 pacijenata od kojih je 74% muškaraca (muški spol predstavlja rizik za razvoj BE i karcinoma jednjaka općenito) te 26% žena. Srednja dob pacijenata pri postavljanju dijagnoze je 63,2 godine što je u skladu sa poznatim podacima jer je ipak BE posljedica dugotrajnog GERB-a uz kombinaciju okolišnih čimbenika. U našoj populaciji bilo je 22 bolesnika sa BE bez displazije, 34 sa BE i displazijom niskog stupnja, 3 bolesnika sa BE i displazijom visokog stupnja te 11 pacijenata sa adenokarcinomom. S obzirom na to da je grupa BE uz displaziju visokog stupnja izrazito mala i statistički neobrađiva, spojena je u grupu bolesnika sa BE i displazijom niskog stupnja tako da ta grupa ima dakle 37 bolesnika. Inače je važno za napomenu da je patohistološki najteže postaviti dijagnozu displazije visokog stupnja, tako da mali broj pacijenata ne iznenađuje. U velikim centrima također postoji sličan problem, to jest najrjeđi su pacijenti sa displazijom visokog stupnja<sup>214</sup>, a upravo ta patohistološka dijagnoza ima direktni utjecaj na

daljnju kliničku odluku jer navedene pacijente treba liječiti bilo endoskopski bilo kirurški. Za zabilježiti je nešto veći broj pacijenata s adenokarcinomom (15% u našoj populaciji u dvije godine) što je s obzirom na ukupni broj pacijenata dosta. U svjetskoj populaciji se također prati porast broja adenokarcinoma jednjaka<sup>76,107</sup> naspram planocelularnom karcinomu. Podaci hrvatske populacije nisu dostupni iz razloga što u našem registru nema podjele karcinoma jednjaka na adeno i planocelularni karcinom to jest u registru su zavedeni zajedno.<sup>215</sup> Distribucija spola u različitim fazama BE nije statistički značajna, dakle nismo dokazali da je muški spol onaj kod kojeg će biti više bolesnika sa displazijom i adenokarcinomom nego kod žena. Za navedeno ipak postoji trend, ali za statističku potvrdu potrebno je imati puno veću skupinu bolesnika. Dob bolesnika je, logično, bila povezana sa razvojnim fazama BE i statistički je signifikantna. Najmlađi pacijenti su bili u skupini BE bez displazije (srednja dob 58,5 godina), dok su pacijenti sa displazijom i adenokarcinomom bili stariji (srednja dob 65,8 i 64,3 godine). Zanimljivo je da nije bilo statistički značajne razlike između dobi bolesnika sa displazijom i karcinomom, što bi se moglo obrazložiti i bržom progresijom bolesti kada se pojavi displazija epitela. Ipak ovakav zaključak zahtijeva dugotrajne epidemiološke studije jer mi samo možemo zabilježiti vrijeme kada se pojavi displazija i karcinom, ali trajanje slijeda razvoja prema karcinomu je nepoznato ako nam pacijent nije bio u dugoročnim kontrolama. Po nizu studija i metaanaliza smatra se da je kod nedisplastičnog BE progresija prema adenokarcinomu 5,98/1000 bolesnika godišnje, kumulativno 0-5%.<sup>168</sup> Rizik od prelaska LGD-a u adenokarcinom se razlikuje u brojnim studijama; od 16,98/1000 bolesnika godišnje<sup>74</sup> do 2,3/1000 bolesnika godišnje.<sup>105</sup> Procijenjeni ukupni rizik od progresije prema adenokarcinomu kod LGD je 0,6-1,2% godišnje.<sup>168,172</sup> Međutim postoji velika interopservacijska varijabilnost. Dokazano je da kada veći broj patologa, više od 2, potvrdi dijagnozu LGD-a, kumulativno napredovanje prema adenokarcinomu je češće, 41% naspram 28%, a kada tri patologa potvrde dijagnozu, kumulativni rizik je 80%.<sup>106</sup> Iako postoji puno više dokaza za stupanj progresije HGD-a prema adenokarcinomu, i tu se podaci razlikuju, od 16% tokom 7 godina<sup>107</sup> do 50% tokom 5 godina.<sup>108</sup> Što se tiče mutacije proteina MSI te p53 to jest njihove ekspresije nisu utvrđene razlike analizirajući ih sa spolom ili sa dobi bolesnika. Dobro je poznato da je muški spol rizični faktor razvoja adenokarcinoma<sup>79,80</sup> dok za dob bolesnika ne postoje jasni podaci<sup>77</sup>, a u literaturi nema istraživanja koja bi povezala ekspresiju određenih biomarkera sa dobi ili spolom bolesnika u smislu povišenog rizika razvoja adenokarcinoma. Iako je za konačne zaključne potreban veći broj bolesnika u studijama, na osnovu naših podataka možemo zaključiti da se MSI ne javlja češće kod muškaraca, a također da MSI adenokarcinomi jednjaka nisu tipični za raniju životnu dob. Kod kolorektalnog

karcinoma također nije zabilježena veza MSI i muškog spola ali je jasno dokazano da se MSI kolorektalni karcinom češće javlja u ranijoj životnoj dobi.<sup>190</sup>

Ispitujući ekspresiju određenih proteina u različitim fazama bolesti, opažena je statistički značajna razlika u ekspresiji MLH1 u različitim fazama razvoja BE ( $\chi^2 = 8,571$ ;  $ss = 2$ ;  $P = 0,014$ , koeficijent kontigencije = 0,330). Mutacija MLH1 bila je prisutna kod 81,8% (9/11) bolesnika sa adenokarcinomom, zatim 67,6% (25/37) s displazijom i 50% (11/22) bez displazije. Logično, ekspresija PMS2 (koji je dio heterodimera MLH1/PMS2) je također statistički značajna ( $\chi^2 = 7,856$ ;  $ss = 2$ ;  $P = 0,019$ , koeficijent kontigencije = 0,318), te je kod bolesnika s adenokarcinomom mutacija najčešće bila prisutna (kod njih 81,8%), zatim kod 54,5% (10/22) bolesnika bez displazije i 64,9% (24/37) s displazijom. Takav nalaz je očekivan s obzirom da MLH1 i PMS2 formiraju heterodimer i mutacija (to jest ekspresija) jednog najčešće prati ekspresiju drugog. Gore navedeni rezultati ukazuju da bi određivanje imunohistokemijske ekspresije MLH1/PMS2 mogao biti dobar potencijalni biomarker u praćenju pacijenta i odluci o daljnjoj terapiji. Međutim ostaje otvoreno pitanje osjetljivosti i specifičnosti mutacije s obzirom na mali broj pacijenata u studiji te podatku da se mutacija javila u velikom postotku kod pacijenata bez displazije. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa nekoliko postojećih studija kod kojih je utvrđena niska prevalencija MSI-H adenokarcinoma jednaka (3,5% i 6,6%).<sup>212,213</sup> S druge strane studija Cai et al<sup>210</sup> pokazala je MSI kod 65% pacijenata sa adenokarcinomom ali također prisustvo MSI i u okolnom tkivu koje je imalo samo znakove metaplazije i displazije epitela. U našem istraživanju nismo koristili imunohistokemijsko bojanje kod pacijenta kod kojeg bi patohistološki našli različit nalaz (npr iz jednog bioptičkog uzorka BE bez displazije, iz drugog sa displazijom), ali svejedno smatramo da pacijenti sa MLH1/PMS2 mutacijom u fazi metaplazije ili displazije zahtijevaju češće praćenje i raniju endoskopsku terapiju. Za definitivnu potvrdu su potrebne studije sa većim brojem pacijenata.

Također je utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji MSH2 ( $\chi^2 = 9,256$ ;  $ss = 2$ ;  $P = 0,019$ , koeficijent kontigencije = 0,342). Niti jedan bolesnik s displazijom, kao niti s adenokarcinomom nije imao prisutnu mutaciju MSH2, u odnosu na 18,2% (4/22) sudionika bez displazije. Navedno prati i ekspresija MSH6 koja je također statistički značajna ( $\chi^2 = 9,256$ ;  $ss = 2$ ;  $P = 0,018$ , koeficijent kontigencije = 0,342) i u potpunosti prati ekspresiju MSH2. Po našim rezultatima to bi značilo da ekspresija navedena dva proteina ne bi bila važna u praćenju bolesnika sa BE. Ovaj podatak malo iznenađuje jer se, po dosadašnjim istraživanjima (iako naravno ne svim) ekspresija MLH1 i MLH2 većinom poklapala.<sup>191,195,210</sup> Razlog ovakvim rezultatima se može objasniti time što većina sporadičnih kolorektalnih

karcinoma nastaje "utišavanjem" MLH1 gena procesom hipermetilacije MLH1 promotera, a sama somatska inaktivacija MSH2 je vrlo rijetka.<sup>216</sup> Gubitak MSH2 ekspresije najčešće prati tumor povezan sa HNPCC. Navedeno može biti objašnjenje naših rezultata gdje nismo pronašli statistički značajan gubitak MSH2/MSH6 ekspresije što bi logično ukazalo da adenokarcinom jednjaka nije dio HNPCC već nastaje sporadično, a ako se javlja u sklopu MSI, najčešće nastaje zbog izolirane mutacije MLH1/PMS2. Stoga bi mogli doći do zaključka da je isključivo imunohistokemija ekspresije MLH1/PMS2 dovoljna u detekciji pacijenata sa povišenim rizikom te njihovom dugoročnom praćenju. Naravno da je za potvrdu navedenog zaključka potreban veći broj studija.

Statistički značajna, pozitivna korelacija je utvrđena između MLH 1 i PMS 2 proteina, kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina. Porastom vrijednosti MLH1 rastu i vrijednosti PMS2, a navedena korelacija je najjača u skupini bolesnika s adenokarcinomom (koeficijent korelacije 1). Navedena korelacija je utvrđena u svim skupinama: kod pacijenata bez displazije  $P > 0,001$ , Phi koeficijent = 0,913, a kod pacijenata sa displazijom  $P < 0,001$ ; Phi koeficijent = 0,941 što ukazuje na snažnu pozitivnu povezanost ekspresije dva proteina. Praktično, u klinici to znači da ako je u bioptičkim uzorcima pronađen BE bez displazije ili sa displazijom, i da je imunohistokemijski utvrđen gubitak ekspresije MLH1/PMS2, onda navedene pacijente treba shvatiti kao one koji imaju vrlo povišen rizik od razvoja adenokarcinoma pa im treba ponuditi ranije endoskopsko liječenje i češće praćenje. Također je utvrđena snažna statistički značajna, pozitivna korelacija između MSH 2 i MSH 6 proteina, kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina: kod bolesnika bez displazije  $P > 0,001$ , Phi koeficijent  $> 0,999$ ), dok niti jedan bolesnik sa displazijom ili adenokarcinomom nije imao mutaciju MSH2/MSH6. To je također očekivano jer je riječ o heterodimeru<sup>175,176</sup> što potvrđuje našu sumnju da navedeni proteini nemaju veći utjecaj na razvoj adenokarcinoma jednjaka. Naše istraživanje također potvrđuje poznate literature podatke da je nužno vršiti imunohistokemijsko bojanje svih proteina mikrosatelitske nestabilnosti. Iako po našim rezultatima postoji jasna veza ekspresije MLH1 i PMS2 te MSH2 i MSH6, isključivim imunohistokemijskim bojanjem na MLH1 i MSH2 osjetljivost za detekciju MSI je 85%, dok upotrebom sva 4 protutijela osjetljivost raste na 95% i skoro je potpuno jednaka kao genetsko testiranje u detekciji MSI.<sup>190-192</sup>

Nije utvrđena statistički značajna povezanost mutacije MSH2 i MLH1 proteina kod bolesnika bez displazije Barrettovog jednjaka, što je i očekivano s obzirom na gore detaljno obrazložene rezultate. Analizu nije bilo moguće uraditi kod bolesnika sa displazijom i adenokarcinomom jer nitko od njih nije imao mutaciju MSH2.

Vrijednosti p53 su definirane kao pozitivne u slučaju bojanja više od 10% stanica i to je definirano kao patološki nalaz. U ukupnoj populaciji p53 je bio pozitivan kod 60 pacijenata i to 19 (86%) bez displazije, 32 (86%) sa displazijom te 9 (81%) sa adenokarcinomom. Statistički značajne razlike nije bilo. Ovaj rezultat je donekle različit od očekivanog i od nekih prethodnih istraživanja gdje ekspresije p53 nije bila dokazana u toliko velikom postotku kod pacijenata bez displazije. Međutim dostupni literaturni podaci su poprilično oprečni. Ekspresija p53 je po različitim studijama utvrđena u 53-87% pacijenata sa adenokarcinomom, 55-100% pacijenata sa HGD, 0-71% pacijenata sa LGD ali ne i kod BE bez displazije.<sup>217-222</sup> Ipak poznato je da ako se BE definira kao onaj bez displazije, a u okolnom tkivu nađemo ekspresiju p53, izrazito raste rizik multifokalne HGD i adenokarcinoma.<sup>219</sup> Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije MLH1 i p53 proteina (Fisherov Egzaktni test;  $P = 0,036$ ; Phi koeficijent = 0,281), te PMS2 i p53 proteina (Fisherov Egzaktni test;  $P = 0,043$ ; Phi koeficijent = 0,257) kod bolesnika sa displazijom. Bolesnici koji su imali pozitivan nalaz, odnosno ekspresiju p53 češće su bili bez mutacije MLH1 i PMS2 proteina, dok su sudionici bez ekspresije p53 češće imali mutaciju MLH1 i PMS2 proteina. Takav nalaz generalno nije za očekivati jer bi bilo logično da ekspresija p53 (koja je patološka i dokazano povisuje rizik od adenokarcinoma) prati gubitak ekspresije (dakle mutaciju) proteina mikrosatelitske nestabilnosti. Međutim s obzirom na mali broj pacijenata u našoj populaciji bolesnika, potrebno je više multicentričnih kontroliranih studija kojima bi se potvrdila naša opažanja. Ipak pošto ovakvo istraživanje kod bolesnika sa BE još do sada nije provedeno, ne možemo dati konkretne zaključke jer u literaturi nema podataka koji bi se mogli usporediti. U skupini bolesnika bez displazije i adenokarcinomom nije nađeno statistički značajne povezanosti ekspresije proteina mikrosatelitske nestabilnosti i p53. Ovakvi rezultati ukazuju na izrazito velik broj, još očit nepoznatih, genetskih mutacija i puteva koje utječu na konačni razvoj adenokarcinoma jednjaka.

## 8. ZAKLJUČAK

Na temelju naših istraživanja a u skladu sa zadanim ciljevima zaključujemo:

1. Utvrđena je statistički značajna razlika u dobi između bolesnika s BE i displazijom: najmlađi sudionici bili su u skupini bez displazije, dok su najstariji sudionici bili u skupini s displazijom.

2. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između spola i dobi u odnosu na ekspresiju pojedinih ispitivanih gena (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, p53).

3. Utvrđene su statistički značajne razlike ekspresije ispitivanih gena s obzirom na displaziju i adenokarcinom:

- Mutacija MLH1 je bila prisutna u 81,8% onih s adenokarcinomom jednjaka, zatim u 67,6% sudionika s displazijom te u 50% njih bez displazije.
- Niti jedan sudionik s displazijom i s adenokarcinomom nije imao prisutnu mutaciju MSH2, u odnosu na 18,2% (4/22) sudionika bez displazije.
- Mutacija PMS2 najčešće je bila prisutna u onih s adenokarcinomom (81,8%), a zatim u 64,9% njih s displazijom i 54,5% sudionika bez displazije.
- Niti jedan od sudionika iz skupine s displazijom, kao niti iz skupine s adenokarcinomom nije imao prisutnu mutaciju MSH 6, u odnosu na 18,2% sudionika iz skupine bez displazije,

4. Međusobna povezanost pojedinih ispitivanih proteina:

- **Pozitivna je korelacija između MLH1 i PMS2 proteina**, kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina (bez displazije, displazija, adenokarcinom): s porastom vrijednosti MLH 1 proteina, rastu i vrijednosti PMS 2 proteina. Kod gotovo svih sudionika s mutacijom PMS2 javila se i mutacija MLH1. Određivanje imunohistokemijske ekspresije MLH1/PMS2 mogao biti dobar potencijalni biomarker u praćnju pacijenta i odluci o daljnjoj terapiji.
- **Povezanost MSH 2 i MSH 6 proteina**: utvrđena je snažna statistički značajna, pozitivna korelacija između MSH 2 i MSH 6 proteina, kako u cijelom uzorku, tako i unutar pojedinih skupina: s porastom vrijednosti MSH 2 proteina, rastu i vrijednosti MSH 6 proteina. Međutim, nitko od sudionika iz skupine s displazijom, kao niti iz skupine s adenokarcinomom nije imao mutaciju MSH 6, niti MSH 2 proteina tako da možemo zaključiti da navedeni proteini nemaju veći utjecaj na razvoj adenokarcinoma jednjaka.

- **Povezanost MLH1 i MSH2 proteina:** nije utvrđena statistički značajna povezanost mutacije MSH 2 i MLH 1 proteina kod sudionika bez displazije Barrettovog jednjaka.
- **Razlika u mutaciji MLH 1, PMS 2, MSH 2 i MSH 6 proteina s obzirom na ekspresiju p53 proteina:** bolesnici koji su imali ekspresiju p53 češće su bili bez mutacije MLH 1 i PMS 2 proteina, dok su sudionici bez ekspresije p53 češće imali mutaciju MLH 1 i PMS 2 proteina, međutim statistički značajna razlike je utvrđena samo kod pacijenata sa displazijom.



## 9. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Cilj istraživanja je analiza gubitka ekspresije proteina sustava popravka pogrešno sparenih baza u metaplazija-displazija-adenokarcinom slijedu Barrett jednjaka.

Retrospektivno su analizirani podaci za 70 pacijenata sa patohistološkom dijagnozom Barrett jednjaka ili adenokarcinoma jednjaka sa Kliničkog Zavoda za Patologiju i Citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od siječnja 2009 do siječnja 2011. Pacijenti su bili podijeljeni u tri skupine: BE bez displazije (22 pacijenta), BE sa displazijom (37 pacijenata) te adenokarcinom (11 pacijenata). Imunohistokemijska ekspresija MLH1, MSH2, PMS2 i MSH6 MMR sustava je izmjerena i uspoređena sa ekspresijom tumor proteina p53. Gubitak ekspresije MLH1 je uočen kod 81,8% pacijenata sa karcinom, 34,4% sa displazijom te 50% bez displazije. Gubitak ekspresije PMS2 je uočen kod 81,8% pacijenata sa karcinomom, 35,1% sa displazijom te 54,5% pacijenata bez displazije. 18,2% pacijenata bez displazije je imalo gubitak ekspresije MSH2 te MSH6, dok ni jedan pacijent sa karcinomom ili sa displazijom nije imao gubitak ekspresije navedenih proteina. Uočena je pozitivna korelacija između MLH1 i PMS2 ekspresije (Spearman  $\rho$  0.97;  $P < 0.001$ ) te između MSH2 i MSH6 ekspresije (Spearman  $\rho$  0.90,  $P < 0.001$ ) u cijelom uzorku te svakoj pojedinačnoj grupi. Nije uočena značajna korelacija MLH1 i PMS2 sa p53 ekspresijom, osim u grupi pacijenata sa displazijom ( $\phi$  0.402,  $P = 0.030$  for MSH1;  $\phi$  0.371,  $P = 0.042$  for PMS2).

Iako smo pokazali značajan gubitak ekspresije MLH1 i PMS2 u BE metaplazija – karcinoma slijedu, zbog retrospektivnog dizajna studije i niskog broja pacijenata ne možemo zaključiti da se trenutno MLH1 i PMS 2 mogu upotrebljavati kao biomarkeri u praćenju pacijenata ili odluci o daljnjem liječenju.

## 10. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Aim of this study was to analyze the loss of mismatch repair (MMR) system protein expression in metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett esophagus (BE).

This study retrospectively analyzed the data from 70 patients with pathohistological diagnosis of BE or esophageal adenocarcinoma (EAC) treated at the Clinical Department of Pathology and Cytology, University Hospital Center Zagreb, from January 2009 to January 2011. Patients were divided into three groups: BE without dysplasia (22 patients), BE with dysplasia (37 patients), and EAC (11 patients). Immunohistochemical expression of MutL homologue 1 (MLH1), MutS homologue 2 (MSH2), postmeiotic segregation increased 2 (PMS2), and MutS homologue 6 (MSH6) of DNA MMR system was measured and compared with tumor protein p53 expression.

Total of 81.8% and 81.8% patients with EAC, 32.4% and 35.1% patients with dysplasia, and 50% and 54.5% patients without dysplasia had loss of MLH1 and PMS2 expression, respectively. Patients with EAC and patients with dysplasia did not have loss of MSH2 and MSH6 expression, and 18.2% patients without dysplasia had loss of MSH2 and MSH6 expression. There was a strong positive correlation between MLH1 and PMS2 expression (Spearman  $\rho$  0.97;  $P < 0.001$ ) and between MSH2 and MSH6 expression (Spearman  $\rho$  0.90,  $P < 0.001$ ) in the entire sample and in all BE groups. No significant correlations of MLH1 and PMS2 with p53 expression were found, except in dysplasia group ( $\phi$  0.402,  $P = 0.030$  for MSH1;  $\phi$  0.371,  $P = 0.042$  for PMS2).

Although we demonstrated considerable loss of MLH1 and PMS2 expression in BE-associated carcinoma sequence, due to the retrospective study design and low number of patients we cannot conclude that MLH1 and PMS2 can be used as biomarkers for patient surveillance and therapy-making decisions.

## 11. POPIS LITERATURE

1. Sharma P, McQuaid K, Dent J, et al. AGA Chicago Workshop. A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: the AGA Chicago Workshop. *Gastroenterology*. 2004; 127:310–330.
2. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, et al. Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:1900–1920.
3. Wang KK, Sampliner RE, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:788–797.
4. Shaheen NJ, Richter JE. Barrett's oesophagus. *Lancet*. 2009; 373:850–861.
5. McClave SA, Boyce HW Jr, Gottfried MR. Early diagnosis of columnar-lined esophagus: a new endoscopic criterion. *Gastrointest Endosc*. 1987; 33:413–416.
6. Choi do W, Oh SN, Baek SJ, et al. Endoscopically observed lower esophageal capillary patterns. *Korean J Intern Med*. 2002; 17:245–248.
7. Vianna A, Hayes PC, Moscoso G, et al. Normal venous circulation of the gastroesophageal junction. A route to understanding varices. *Gastroenterology*. 1987; 93:876–889.
8. Paull A, Trier JS, Dalton MD, et al. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Engl J Med*. 1976; 295:476–480.
9. Hayward J. The lower end of the oesophagus. *Thorax*. 1961; 16:36–41.
10. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology* 1990; 99, 918–922.
11. Conio M, Cameron AJ, Romero Y et al. Secular trends in the epidemiology and outcome of Barrett's oesophagus in Olmsted County, Minnesota. *Gut* 2001; 48, 304–309.
12. Ward EM, Wolfsen HC, Achem SR et al. Barrett's esophagus is common in older men and women undergoing screening colonoscopy regardless of reflux symptoms. *Am. J. Gastroenterol*. 2006; 101, 12–17.
13. Freitas MC, Moretzsohn LD, Coelho LG. Prevalence of Barrett's esophagus in individuals without typical symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Arq. Gastroenterol*. 2008; 45, 46–49.

14. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T et al. Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology* 2005; 129, 1825–1831.
15. Zagari RM, Fuccio L, Wallander MA et al. Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett's oesophagus in the general population: the Loiano-Monghidoro study. *Gut* 2008; 57, 1354–1359.
16. Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut* 2006; 55, 442.
17. Alcedo J, Ferrández A, Arenas J et al. Trends in Barrett's esophagus diagnosis in Southern Europe: implications for surveillance. *Dis. Esophagus* 2009; 22, 239–248.
18. Odemis B, Çiçek B, Zengin NI et al. Barrett's esophagus and endoscopically assessed esophagogastric junction integrity in 1000 consecutive Turkish patients undergoing endoscopy: a prospective study. *Dis. Esophagus* 2009; 22, 649–655.
19. Kendall BJ, Whiteman DC. Temporal changes in the endoscopic frequency of new cases of Barrett's esophagus in an Australian health region. *Am. J. Gastroenterol.* 2007; 102, 204–205.
20. Chen X, Zhu LR, Hou XH. The characteristics of Barrett's esophagus: an analysis of 4120 cases in China. *Dis. Esophagus.* 2009; 22, 348–353.
21. Hongo M. Review article: Barrett's oesophagus and carcinoma in Japan. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 20(Suppl. 8), 50–54.
22. Park JJ, Kim JW, Kim HJ et al. The prevalence of and risk factors for Barrett's esophagus in a Korean population: a nationwide multicenter prospective study. *J. Clin. Gastroenterol.* 2009; 43, 907–914.
23. Fouad YM, Makhoul MM, Tawfik HM, el-Amin H, Ghany WA, el-Khayat HR. Barrett's esophagus: prevalence and risk factors in patients with chronic GERD in Upper Egypt. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15, 3511–3515.
24. Gadour MO, Ayoola EA. Barrett's oesophagus and oesophageal cancer in Saudi Arabia. *Trop. Gastroenterol.* 1999; 20, 111–115.
25. Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology* 2007; 133:1198–1209.
26. Jenkins GJ, D'Souza FR, Suzen SH, et al. Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: the potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis* 2007;28:136–142.

27. Ryan AM, Healy LA, Power DG, et al. Barrett esophagus: prevalence of central adiposity, metabolic syndrome, and a proinflammatory state. *Ann Surg* 2008;247:909–915.
28. Suzuki H, Iijima K, Scobie G, et al. Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut* 2005;54:1527–1535.
29. El-Serag HB, Lagergren J. Alcohol drinking and the risk of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2009;136:1155–1157.
30. Wang C, Yuan Y, Hunt RH. Helicobacter pylori infection and Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am. J.Gastroenterol.* 2009; 104: 492–500, quiz 491, 501.
31. Johansson J, Hakansson HO, Mellblom L et al. Risk factors for Barrett's oesophagus: a population-based approach. *Scand. J.Gastroenterol.* 2007; 42: 148–56.
32. Kubo A, Levin TR, Block G et al. Alcohol types and sociodemographic characteristics as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2009; 136: 806–15.
33. Oberg S, Johansson J, Wenner J, Walther B. Metaplastic columnar mucosa in the cervical esophagus after esophagectomy. *Ann Surg* 2002; 235: 338-345
34. Hayward J. The lower end of the oesophagus. *Thorax* 1961; 16: 36-41
35. Chandrasoma PT, Der R, Ma Y, Dalton P, Taira M. Histology of the gastroesophageal junction: an autopsy study. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 402-409
36. Chandrasoma PT, Der R, Ma Y, Peters J, Demeester T. Histologic classification of patients based on mapping biopsies of the gastroesophageal junction. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 929-936
37. Lord RV, Wickramasinghe K, Johansson JJ, Demeester SR, Brabender J, Demeester TR. Cardiac mucosa in the remnant esophagus after esophagectomy is an acquired epithelium with Barrett's-like features. *Surgery* 2004; 136: 633-640
38. Dresner SM, Griffin SM, Wayman J, Bennett MK, Hayes N, Raimes SA. Human model of duodenogastro-oesophageal reflux in the development of Barrett's metaplasia. *Br J Surg* 2003; 90: 1120-1128
39. Der R, Tsao-Wei DD, Demeester T, Peters J, Groshen S, Lord RV, Chandrasoma P. Carditis: a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 245-252
40. Fletcher J, Wirz A, Young J, Vallance R, McColl KE. Unbuffered highly acidic gastric juice exists at the gastroesophageal junction after a meal. *Gastroenterology* 2001; 121: 775-783

41. Iijima K, Henry E, Moriya A, Wirz A, Kelman AW, McColl KE. Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 2002; 122: 1248-1257
42. Csendes A, Maluenda F, Braghetto I, Csendes P, Henriquez A, Quesada MS. Location of the lower oesophageal sphincter and the squamous columnar mucosal junction in 109 healthy controls and 778 patients with different degrees of endoscopic oesophagitis. *Gut* 1993; 34: 21-27
43. Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 13-22
44. Chandrasoma PT, Der R, Dalton P, Kobayashi G, Ma Y, Peters J, Demeester T. Distribution and significance of epithelial types in columnar-lined esophagus. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1188-1193
45. Oberg S, Ritter MP, Crookes PF, Fein M, Mason RJ, Gadensytätter M, Brenner CG, Peters JH, DeMeester TR. Gastroesophageal reflux disease and mucosal injury with emphasis on short-segment Barrett's esophagus and duodenogastroesophageal reflux. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 547-553.
46. Fein M, Ireland AP, Ritter MP, Peters JH, Hagen JA, Bremner CG, DeMeester TR. Duodenogastric reflux potentiates the injurious effects of gastroesophageal reflux. *J Gastrointest Surg* 1997; 1: 27-32.
47. Schweitzer EJ, Bass BL, Batzri S, Harmon JW. Bile acid accumulation by rabbit esophageal mucosa. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 1105-1113
48. Schweitzer EJ, Bass BL, Batzri S, Young PM, Huesken J, Harmon JW. Lipid solubilization during bile salt-induced esophageal mucosal barrier disruption in the rabbit. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 172-179
49. Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest* 1993; 92: 17-24
50. Oberg S, DeMeester TR, Peters JH, Hagen JA, Nigro JJ, DeMeester SR, Theisen J, Campos GM, Crookes PF. The extent of Barrett's esophagus depends on the status of the lower esophageal sphincter and the degree of esophageal acid exposure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 572-580

51. Spechler SJ, Zeroogian JM, Wang HH, Antonioli DA, Goyal RK. The frequency of specialized intestinal metaplasia at the squamo-columnar junction varies with the extent of columnar epithelium lining the esophagus. *Gastroenterology* 1995; 108: A224
52. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231: 303-321
53. Eda A, Osawa H, Satoh K, Yanaka I, Kihira K, Ishino Y, Mutoh H, Sugano K. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 2003; 38: 14-22
54. Faller G, Dimmler A, Rau T, Spaderna S, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Evidence for acid-induced loss of Cdx2 expression in duodenal gastric metaplasia. *J Pathol* 2004; 203: 904-908
55. Gough MD, Ackroyd R, Majeed AW, Bird NC. Prediction of malignant potential in reflux disease: are cytokine polymorphisms important? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1012-1018
56. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993; 105: 119-129
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
58. Fléjou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005; 54 Suppl 1: i6-i12
59. Tosh D, Slack JM. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* Mar;2002 3(3):187-194.
60. Guillem PG. How to make a Barrett esophagus: pathophysiology of columnar metaplasia of the esophagus. *Dig Dis Sci* Mar;2005 50(3):415–424.
61. Johns BA. Developmental changes in the oesophageal epithelium in man. *J Anat* Oct;1952 86(4): 431–442.
62. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:695–723.
63. Daniely Y, Liao G, Dixon D, et al. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* Jul;2004 287(1):C171–181.
64. Wong NA, Wilding J, Bartlett S, et al. CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* May 24;2005 102(21):7565–7570.

65. Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* Oct;2000 119(4):961–971.
66. Phillips RW, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol* Nov;2003 27(11):1442–1447.
67. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* Jul 5;2004 166(1):37–47.
68. Liu T, Zhang X, So CK, et al. Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis* Feb;2007 28(2):488–496.
69. Hu Y, Jones C, Gellersen O, Williams VA, Watson TJ, Peters JH. Pathogenesis of Barrett esophagus: deoxycholic acid up-regulates goblet-specific gene MUC2 in concert with CDX2 in human esophageal cells. *Arch Surg* Jun;2007 142(6):540–544. discussion 544-545.
70. Milano F, van Baal JW, Buttar NS, et al. Bone morphogenetic protein 4 expressed in esophagitis induces a columnar phenotype in esophageal squamous cells. *Gastroenterology* Jun;2007 132(7): 2412–2421.
71. Shaheen NJ, Crosby MA, Bozynski EM, et al. Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett’s esophagus? *Gastroenterology*. 2000; 119:333–8.
72. Spechler SJ. Dysplasia in Barrett’s esophagus: limitations of current management strategies. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100:927–35.
73. Ovaska J, Miettinen M, Kivilaakso E. Adenocarcinoma arising in Barrett’s esophagus. *Dig Dis Sci*. 1989; 34:1336–9.
74. Wani S, Puli SR, Shaheen NJ, et al. Esophageal adenocarcinoma in Barrett’s esophagus after endoscopic ablative therapy: a meta-analysis and systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:502–13.
75. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, et al. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett’s esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008; 168:237–49.
76. O’Connor JB, Falk GW, Richter JE. The incidence of adenocarcinoma and dysplasia in Barrett’s esophagus: report on the Cleveland Clinic Barrett’s Esophagus Registry. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:2037–42.



77. Connor MJ, Weston AP, Mayo MS, et al. The prevalence of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in patients undergoing upper endoscopy for dyspepsia in a VA population. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:920–4.
78. Oberg S, Wenner J, Johansson J, et al. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2005; 242:49–54.
79. Bani-Hani KE, Bani-Hani BK, Martin IG. Characteristics of patients with columnar-lined Barrett's esophagus and risk factors for progression to esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:6807–14.
80. de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ, et al. Risk factors for the development of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:1421–9.
81. Edelstein ZR, Farrow DC, Bronner MP, et al. Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2007; 133:403–11.
82. Vaughan TL, Kristal AR, Blount PL, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, body mass index, and anthropometry in relation to genetic and flow cytometric abnormalities in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11:745–52.
83. Moe GL, Kristal AR, Levine DS, et al. Waist-to-hip ratio, weight gain, and dietary and serum selenium are associated with DNA content flow cytometry in Barrett's esophagus. *Nutr Cancer.* 2000; 36:7–13.
84. Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J, et al. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer.* 1993; 72:1155–8.
85. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, et al. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:1930–6.
86. Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, et al. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:1055–62.
87. Mehta S, Johnson IT, Rhodes M. Systematic review: the chemoprevention of oesophageal adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 22:759–68.
88. Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med.* 2000; 132:612–20.

89. Umansky M, Yasui W, Hallak A, et al. Proton pump inhibitors reduce cell cycle abnormalities in Barrett's esophagus. *Oncogene*. 2001; 20:7987–91.
90. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest*. 1996; 98:2120–8.
91. Haigh CR, Attwood SE, Thompson DG, et al. Gastrin induces proliferation in Barrett's metaplasia through activation of the CCK2 receptor. *Gastroenterology*. 2003; 124:615–25.
92. Hillman LC, Chiragakis L, Shadbolt B, et al. Proton-pump inhibitor therapy and the development of dysplasia in patients with Barrett's oesophagus. *Med J Aust*. 2004; 180:387–91.
93. Ye W, Chow WH, Lagergren J, et al. Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery. *Gastroenterology*. 2001; 121:1286–93.
94. Parrilla P, Martinez de Haro LF, Ortiz A, et al. Long-term results of a randomized prospective study comparing medical and surgical treatment of Barrett's esophagus. *Ann Surg*. 2003; 237:291-8.
95. Corey KE, Schmitz SM, Shaheen NJ. Does a surgical antireflux procedure decrease the incidence of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus? A meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:2390–4.
96. Lundell L, Attwood S, Ell C, et al. Comparing laparoscopic antireflux surgery with esomeprazole in the management of patients with chronic gastro-oesophageal reflux disease: a 3-year interim analysis of the LOTUS trial. *Gut*. 2008; 57:1207–13.
97. Carlson N, Lechago J, Richter J, et al. Acid suppression therapy may not alter malignant progression in Barrett's metaplasia showing p53 protein accumulation. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97:1340–5.
98. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, et al. Protective association of aspirin/ NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2003; 124:47–56.
99. Vaughan TL, Dong LM, Blount PL, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of neoplastic progression in Barrett's oesophagus: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2005; 6:945-52.

100. Weston AP, Badr AS, Hassanein RS. Prospective multivariate analysis of factors predictive of complete regression of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:3420–6.
101. Weston AP, Sharma P, Mathur S, et al. Risk stratification of Barrett's esophagus: updated prospective multivariate analysis. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99:1657–66.
102. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, et al. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2001; 120:1630–9.
103. Montgomery E, Bronner MP, Greenson JK, et al. Are ulcers a marker for invasive carcinoma in Barrett's esophagus? Data from a diagnostic variability study with clinical follow-up. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:27–31.
104. Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol.* 2001; 32:379–88.
105. Lim CH, Treanor D, Dixon MF, et al. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus has a high risk of progression. *Endoscopy.* 2007; 39:581–7.
106. Skacel M, Petras RE, Gramlich TL, et al. The diagnosis of low-grade dysplasia in Barrett's esophagus and its implications for disease progression. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95:3383–7.
107. Rastogi A, Puli S, El-Serag HB, et al. Incidence of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus and high-grade dysplasia: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2008; 67:394–8
108. Reid BJ, Levine DS, Longton G, et al. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95:1669–76.
109. Srivastava A, Hornick JL, Li X, et al. Extent of low-grade dysplasia is a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102:483–93.
110. Wilson JF. The rocky road to useful cancer biomarkers. *Ann Intern Med.* 2006; 144:945–8.
111. Rabinovitch PS, Longton G, Blount PL, et al. Predictors of progression in Barrett's esophagus III: baseline flow cytometric variables. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:3071–83.

112. Teodori L, Gohde W, Persiani M, et al. DNA/protein flow cytometry as a predictive marker of malignancy in dysplasia-free Barrett's esophagus: thirteen-year follow-up study on a cohort of patients. *Cytometry*. 1998; 34:257–63.
113. Huang Q, Yu C, Klein M, et al. DNA index determination with Automated Cellular Imaging System (ACIS) in Barrett's esophagus: comparison with CAS 200. *BMC Clin Pathol*. 2005; 5:7.
114. Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, et al. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumor suppression. *Nature*. 2006; 443:214–7.
115. Skacel M, Petras RE, Rybicki LA, et al. p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97:2508–13.
116. Murray L, Sedo A, Scott M, et al. TP53 and progression from Barrett's metaplasia to oesophageal adenocarcinoma in a UK population cohort. *Gut*. 2006; 55:1390–7.
117. Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, et al. Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene*. 2006; 25:3084–92.
118. Zhuang Z, Vortmeyer AO, Mark EJ, et al. Barrett's esophagus: metaplastic cells with loss of heterozygosity at the APC gene locus are clonal precursors to invasive adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1996; 56:1961–4.
119. Bian YS, Osterheld MC, Fontollet C, et al. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2002; 122:1113–21.
120. Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, et al. Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1316–21.
121. Lao-Sirieix P, Brais R, Lovat L, et al. Cell cycle phase abnormalities do not account for disordered proliferation in Barrett's carcinogenesis. *Neoplasia*. 2004; 6:751–60.
122. Sirieix PS, O'Donovan M, Brown J, et al. Surface expression of minichromosome maintenance proteins provides a novel method for detecting patients at risk for developing adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:2560–6.
123. Chao DL, Sanchez CA, Galipeau PC, et al. Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer outcome in patients with Barrett's esophagus: a long-term prospective study. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:6988–95.

124. Rossi E, Grisanti S, Villanacci V, et al. Her-2 overexpression/amplification in Barrett's esophagus predicts early transition from dysplasia to adenocarcinoma: a clinico-pathologic study. *J Cell Mol Med.* 2008
125. Albrecht B, Hausmann M, Zitzelsberger H, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the detection of DNA sequence copy number changes in Barrett's adenocarcinoma. *J Pathol.* 2004; 203:780–8.
126. Mobius C, Stein HJ, Spiess C, et al. COX2 expression, angiogenesis, proliferation and survival in Barrett's cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005; 31:755–9.
127. Miller CT, Moy JR, Lin L, et al. Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:4819–25.
128. Falk GW, Skacel M, Gramlich TL, et al. Fluorescence in situ hybridization of cytologic specimens from Barrett's esophagus: a pilot feasibility study. *Gastrointest Endosc.* 2004; 60:280–4.
129. Brankley SM, Wang KK, Harwood AR, et al. The development of a fluorescence in situ hybridization assay for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *J Mol Diagn.* 2006; 8:260–7.
130. Sharma P, Morales TG, Sampliner RE. Short segment Barrett's esophagus--the need for standardization of the definition and of endoscopic criteria. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1033-6.
131. Sharma P, Dent J, Armstrong D, Bergman JJ, Gossner L, Hoshihara Y, et al. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. *Gastroenterology* 2006; 131: 1392-9.
132. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105: 40-50
133. Katz PO, Anderson C, Khoury R, Castell DO. Gastro-oesophageal reflux associated with nocturnal gastric acid breakthrough on proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1231-4.
134. Hak NG, Mostafa M, Salah T, El-Hemaly M, Haleem M, Abd El-Raouf A, et al. Acid and bile reflux in erosive reflux disease, nonerosive reflux disease and Barrett's esophagus. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 442-7.
135. Brkic T, Kalauz M, Ostojic R. Novel endoscopic optical techniques for the detection of early gastrointestinal neoplasia. *Liječ Vjesn* 2009;131:69–73

136. Stevens PD, Lightdale CJ, Green PH, et al. Combined magnification endoscopy with chromoendoscopy for the evaluation of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 1994;40:747-9.
137. Ragunath K, Krasner N, Raman VS, et al. A randomized, prospective cross-over trial comparing methylene blue-directed biopsy and conventional random biopsy for detecting intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2003;35:998-1003.
138. Ngamruengphong S et al: Diagnostic yield of methylene blue chromoendoscopy for detecting specialized intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2009 May;69(6):1021-9.
139. Fortun PJ, Anagnostopoulos GK, Kaye P, et al. Acetic acid-enhanced magnification endoscopy in the diagnosis of specialized intestinal metaplasia, dysplasia and early cancer in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:735-42.
140. Kara, MA, Ennahachi, M, Fockens, P, et al. Detection and classification of the mucosal and vascular patterns (mucosal morphology) in Barrett's esophagus by using narrow band imaging. *Gastrointest Endosc* 2006; 64:155.
141. Mannath J et al: Narrow band imaging for characterization of high grade dysplasia and specialized intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: a meta-analysis. *Endoscopy* 2010; 42(5):351-9.
142. Dorer R, Odze RD. AMACR immunostaining is useful in detecting dysplastic epithelium in Barrett's esophagus, ulcerative colitis, and Crohn's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30: 871-7.
143. Kiesslich R, Gossner L, Goetz M et al. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 4: 979-87.
144. Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, et al. Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:2331.
145. Ye W, Chow WH, Lagergren J, et al. Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery. *Gastroenterology* 2001; 121:1286.
146. Spechler SJ, Sharma P, Traxler B, et al. Gastric and esophageal pH in patients with Barrett's esophagus treated with three esomeprazole dosages: a randomized, double-blind, crossover trial. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:1964.

147. Peghini PL, Katz PO, Castell DO. Ranitidine controls nocturnal gastric acid breakthrough on omeprazole: a controlled study in normal subjects. *Gastroenterology* 1998; 115:1335.
148. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98:2120.
149. Ouatu-Lascar R, Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Differentiation and proliferation in Barrett's esophagus and the effects of acid suppression. *Gastroenterology* 1999; 117:327.
150. Peters FT, Ganesh S, Kuipers EJ, et al. Endoscopic regression of Barrett's oesophagus during omeprazole treatment; a randomised double blind study. *Gut* 1999; 45:489.
151. Shaheen NJ, Inadomi JM, Overholt BF, Sharma P. What is the best management strategy for high grade dysplasia in Barrett's oesophagus? A cost effectiveness analysis. *Gut* 2004; 53:1736.
152. Vij R, Triadafilopoulos G, Owens DK, et al. Cost-effectiveness of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2004; 60:739.
153. van Lanschot JJ, Hulscher JB, Buskens CJ, et al. Hospital volume and hospital mortality for esophagectomy. *Cancer* 2001; 91:1574.
154. Van Laethem JL, Peny MO, Salmon I, et al. Intramucosal adenocarcinoma arising under squamous re-epithelialisation of Barrett's oesophagus. *Gut* 2000; 46:574.
155. Wani S, Puli SR, Shaheen NJ, et al. Esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus after endoscopic ablative therapy: a meta-analysis and systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:502.
156. Inadomi JM, Somsouk M, Madanick RD, et al. A cost-utility analysis of ablative therapy for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2009; 136:2101.
157. Sharma VK, Kim HJ, Das A, et al. A prospective pilot trial of ablation of Barrett's esophagus with low-grade dysplasia using stepwise circumferential and focal ablation (HALO system). *Endoscopy* 2008; 40:380.
158. Fleischer DE, Overholt BF, Sharma VK, et al. Endoscopic ablation of Barrett's esophagus: a multicenter study with 2.5-year follow-up. *Gastrointest Endosc* 2008; 68:867.

159. Fleischer DE, Overholt BF, Sharma VK, et al. Endoscopic radiofrequency ablation for Barrett's esophagus: 5-year outcomes from a prospective multicenter trial. *Endoscopy* 2010; 42:781.
160. Shaheen NJ, Sharma P, Overholt BF, et al. Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *N Engl J Med* 2009; 360:2277.
161. Shaheen NJ, Greenwald BD, Peery AF, et al. Safety and efficacy of endoscopic spray cryotherapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 2010; 71:680.
162. Ell C, May A, Pech O, et al. Curative endoscopic resection of early esophageal adenocarcinomas (Barrett's cancer). *Gastrointest Endosc* 2007; 65:3.
163. van Vilsteren FG, Pouw RE, Seewald S, et al. Stepwise radical endoscopic resection versus radiofrequency ablation for Barrett's oesophagus with high-grade dysplasia or early cancer: a multicentre randomised trial. *Gut* 2011; 60:765.
164. Schnell TG, Sontag SJ, Chejfec G, et al. Long-term nonsurgical management of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 2001; 120:1607.
165. Spechler SJ, Sharma P, Souza RF et al. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2011;140:1084-1091.
166. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2043.
167. Spechler SJ. The frequency of esophageal cancer in patients with Barrett's esophagus. *Acta Endoscopica* 1992; 22:541.
168. de Jonge PJ, van Blankenstein M, Looman CW, et al. Risk of malignant progression in patients with Barrett's oesophagus: a Dutch nationwide cohort study. *Gut* 2010; 59:1030.
169. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, et al. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 168:237.
170. Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH Jr. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:383.
171. Peters JH, Clark GW, Ireland AP, et al. Outcome of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus in endoscopically surveyed and nonsurveyed patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:813.
172. Sharma P, Falk GW, Weston AP, et al. Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:566.



173. Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:586.
174. Konda VJ, Ross AS, Ferguson MK, et al. Is the risk of concomitant invasive esophageal cancer in high-grade dysplasia in Barrett's esophagus overestimated? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:159.
175. Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 1997;91:995–1005.
176. Blackwell LJ, Martik D, Bjornson KP, Bjornson ES, Modrich P. Nucleotide- promoted release of hMutSa from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* 1998;273:32055–62.
177. Mihaylova VT, Bindra RS, Yuan J, Campisi D, Narayanan L, Jensen R, Giordano F, Johnson RS, Rockwell S, Glazer PM. Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2003;23:3265–73.
178. Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, Huang LE. HIF-1a induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSa expression. *Mol Cell* 2005;17:793–803.
179. Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:7444–8.
180. Youn CK, Cho HJ, Kim SH, Kim HB, Kim MH, Chang IY, Lee JS, Chung MH, Hahn KS, You HJ. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat Cell Biol* 2005;7:137–47.
181. Christmann M, Kaina B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J Biol Chem* 2000;275:36256–62.
182. Luo Y, Lin FT, Lin WC. ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol Cell Biol* 2004;24:6430–44.
183. Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 2003;34:326–9.
184. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993, 260:812–816
185. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al.: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition:

- development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998, 58:5248–5257
186. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al.: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96:261–268.
  187. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL et al.: Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers* 2004, 20:237–250.
  188. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al.: Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002, 70:26–37.
  189. Buttin BM, Powell MA, Mutch DG et al.: Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. *Am J Hum Genet* 2004, 74:1262–1269.
  190. de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y et al.: Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:972–980
  191. Shia J, Klimstra DS, Nafa K et al.: Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005, 29:96–104
  192. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W et al.: Tumours from MSH2 mutation carriers show loss of MSH2 expression but many tumours from MLH1 mutation carriers exhibit weak positive MLH1 staining. *J Pathol* 2005, 207:385–395
  193. Peltomaki P, Vasen H: Mutations associated with HNPCC predisposition- update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004, 20:269–276.
  194. Jascur T, Boland CR: Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer* 2006, 119:2030–2035.
  195. Fishel R: The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 2001, 61:7369–7374.
  196. Koi M, Umar A, Chauhan DP et al.: Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994, 54:4308–4312.

197. Roncari B, Pedroni M, Maffei S et al.: Frequency of constitutional MSH6 mutations in a consecutive series of families with clinical suspicion of HNPCC. *Clin Genet* 2007, 72:230–237.
198. Shia J, Ellis NA, Klimstra DS: The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004, 445:431–441.
199. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5248–5257 (1998).
200. Hendriks, Y. M. *et al.* Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J. Clin.* 56, 213–225 (2006).
201. Aaltonen, L. A. *et al.* Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N. Engl. J. Med.* 338, 1481–1487 (1998).
202. Chen, S. *et al.* Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* 296, 1479–1487 (2006).
203. Stoffel, E. *et al.* Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 137, 1621–1627 (2009).
204. Vogelstein, B. *et al.* Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207–211 (1989).
205. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* 62, 2447–2454 (2002).
206. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767 (1990).
207. H. T. Lynch, T. Smyrk, and J. R. Jass, “Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and colonic adenomas: aggressive adenomas?” *Seminars in Surgical Oncology*, vol. 11, no. 6, pp. 406–410, 1995.
208. H. T. Lynch, T. Smyrk, T. McGinn, et al., “Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP,” *Cancer*, vol. 76, no. 12, pp. 2427–2433, 1995.

209. F. E.M.Rijcken,H.Hollema, and J. H. Kleibeuker, "Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation," *Gut*, vol. 50, no. 3, pp. 382–386, 2002.
210. Cai JC, Liu D, Zhang HP, Zhong S, Xia NS. Microsatellite alterations in phenotypically normal esophageal squamous epithelium and metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *World J Gastroenterol*. 2008 7;14:4070-6.
211. Kulke MH, Thakore KS, Thomas G et al. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer*. 2001 15;91:1451-7.
212. Falkenback D, Johansson J, Halvarsson B, Nilbert M. Defective mismatch-repair as a minor tumorigenic pathway in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;157:82-6.
213. Farris AB, Demicco EG, Le LP, Finberg KE et al. Clinicopathologic and molecular profiles of microsatellite unstable Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35: 647-55.
214. Yousef F, Cardwell C, Marie M et al. The Incidence of Esophageal Cancer and High-Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:237–249
215. Strbad M. Adenokarcinom jednjaka-epidemiologija svijet i Hrvatska. U: Algoritmi u gastrointestinalnoj endoskopiji i endoskopskom ultrazvuku. (ur.) Pulanić R. Medicinska naklada, Zagreb 2012:1-13.
216. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998;58:1713–8.
217. Gleeson CM, Sloan JM, McManus DT, *et al*: Comparison of p53 and DNA content abnormalities in adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia. *Br J Cancer* 77: 277-286, 1998.
218. Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, *et al*: Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 89: 1729-1735, 2003.
219. Gimenez A, Minguela A, Parrilla P, *et al*: Flow cytometric DNA analysis and p53 protein expression show a good correlation with histologic findings in patients with Barrett's esophagus. *Cancer* 83: 641-651, 1998.

220. Feith M, Stein HJ, Mueller J and Siewert JR: Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 17: 322-327, 2004.
221. Younes M, Lebovitz RM, Lechago LV and Lechago J: p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterology* 105: 1637-1642, 1993.
222. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, Tubbs RR, Kirby TJ and Casey G: p53 immunoreactivity in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 1132-1137, 1994.

## 12. ŽIVOTOPIS

Pave Markoš, doktor medicine, specijalist interne medicine, subspecijalist gastroenterologije i hepatologije, rođen 23.03.1980.godine.

Nakon završene osnovne škole i klasične gimnazije u Splitu, diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu 2004.godine.

Dobitnik dvije rektorove nagrade 1999 i 2001.godine te od strane dekana posebnog priznanja za uspjehe tokom fakultetskog obrazovanja.

Pripravnički staž odrađen na KBC-u Split, a potom 6 mjeseci zaposlen u HMP Split.

Od 2007 stalni zaposlenik Kliničkog bolničkog Centra Zagreb, na specijalizaciji iz Interne medicine koju završava 2011. godine, a potom i subspecijalizaciju iz gastroenterologije i hepatologije 2013.godine.

Od 2011 stalno radno mjesto u Centru Interventne gastroenterologije KBC-a Zagreb gdje svakodnevno radi na polju gastrointestinalne endoskopije te UZV-a sa više od 3000 raznih endoskopskih dijagnostičkih i intervencijskih procedura godišnje (gastroskopije, kolonoskopije, enteroskopija, UZV, kapsula endoskopija, ERCP). Vlada svim endoskopskim zahvatima koji se izvode u gastrointestinalnoj endoskopiji sa posebnim naglaskom na patologiju jednjaka, gdje kao najznačajnije izdvajam radiofrekventnu ablaciju Barrett jednjaka koju izvodi jedini u Hrvatskoj.

U više navrata educiran u inozemstvu iz polja gastrointestinalne endoskopije te upalnih bolesti crijeva i hepatologije.

Autor više poglavlja u knjigama iz područja gastroenterologije te aktivnu učesnik niza domaćih i međunarodnih kongresa kao slušač i aktivni predavač.

Član Hrvatskog gastroenterološkog društva te predsjednik Radne skupine za gastroskopiju koja je donijela smjernice izvođenja gastroskopije na razini Republike Hrvatske.

Oženjen, otac troje djece.