

Rano otkrivanje adenokarcinoma jednjaka u sluznici Barrettovog jednjaka

Early discovery of esophagus adenocarcinoma in Barret's mucosa

Melanija Ražov Radas, Nataša Lisica Šikić*

Sažetak

Osnovna hipoteza ovoga rada je pokušaj da se jasno dokaže izražajnost mucinoznog glikoproteina MUC 2 i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) na sluznici oboljelih od Barrettovog jednjaka, te pokušaj dokazivanja povezanosti s izražajnošću ovih antigena u sve češćoj pojavnosti adenokarcinoma jednjaka na sluznici Barrettovog jednjaka. U izvornu je studiju uključeno 36 ispitanika s dijagnozom Barrettovog jednjaka, nakon prve ezofagogastroduodenoskopije, ali je nakon patološke analize bioptata ezofagogastričnog spoja u četvoro ispitanika dokazan adenokarcinom. Izražajnost MUC 2 i VEGF-a, određena je imunohistokemijskom analizom. MUC 2 bio je pozitivan u troje ispitanika s adenokarcinomom, a VEGF također u troje, što daje naslutiti da angiogeneza ima važnu ulogu u zamjeni normalne sluznice jednjaka s Barrettovom sluznicom.

Ključne riječi: Barrettov jednjak, adenokarcinom, imunohistokemija MUC 2 i VEGF

Summary

The aim of this study was to evaluate the expression of Mucin 2 glycoprotein (MUC2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Barrett's mucosa in association with higher risk for the development of adenocarcinoma (AC). The study included a group of 36 patients with diagnosis of Barrett's esophagus (BE) after esophagogastroduodenoscopy, but the pathohistological analysis of esophagogastric junction (EGJ) mucosa showed adenocarcinoma in four patients. The expression of MUC2 and VEGF was performed with immunohistochemistry. MUC2 was expressed in three patients, and VEGF expression was present at three patients in the study, which suggested that angiogenesis could have an important role in replacing normal esophageal mucosa with Barrett's mucosa.

Key words: Barrett's esophagus, adenocarcinoma, immunohistochemistry of MUC 2 and VEGF

Med Jad 2018;48(3):91-98

Uvod

Praćenjem promjena na ezofagogastričnom (EG) spoju u oboljelih od refluksne bolesti, zabilježene su sve učestalije promjene EG-spoja u smislu otočića vilozno promijenjene sluznice. Patohistološkom obradom dobivenih bioptičkih uzoraka, sve je učestalija dijagnoza Barrettovog jednjaka (BJ). Priroda ove bolesti, njezina progresija i brzina progresije prema malignoj bolesti još uvijek nije do kraja istražena.

Bolesnici često imaju gastroezofagealnu refluksnu bolest (GERB) s kroničnim refluksnim simptomima dulje od 10 godina, koja prethodi razvoju BJ-a.^{1,2}

Gotovo 95% bolesnika koji razviju karcinom EG-spoja nisu znali da boluju od BJ-a, te da je evolucija od BJ-a do karcinoma trajala 20-30 godina.² U istraživanju Garud i sur.,³ prevalencija BJ-a kreće se 0,9-4,5%, uz progresiju u adenokarcinom u 0,5% slučajeva po bolesniku u godinu dana.

Protetkih 20 godina incidencija skvamoznog (planocelularnog) karcinoma je stalna, dok je incidencija adenokarcinoma jednjaka i ezofagogastričnog (EG) spoja viša od incidencije bilo kojeg drugog karcinoma u ljudskoj populaciji. Povezanost između metaplazije-displazije-adenoma već je dugo poznata.³ Razvoj adenokarcinoma (CA) u korelaciji je s

* Opća bolnica Zadar, Služba za internu medicinu, Odjel za gastroenterologiju (dr. sc. Melanija Ražov Radas, dr. med.), Odjel za patologiju i sudsku medicinu (Nataša Lisica Šikić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje / Correspondence address: Dr. sc. Melanija Ražov Radas, dr. med., Opća bolnica Zadar, Služba za interne bolesti, Odjel za gastroenterologiju, Bože Peričića 5, 23 000 Zadar. E-mail: melanija.razov.radas@bolnica-zadar.hr; melanijarr@gmail.com; natasa.lisica.sikic@bolnica-zadar.hr

Primljeno/Received 2017-05-03; Ispravljeno/Revised 2017-05-30; Prihvaćeno/Accepted 2017-05-24

dužinom lezije na jednjaku, te postojanjem i stupnjem displazije.^{1,4}

Helicobacter pylori pozitivni bolesnici imaju blaže oblike GERB-a, manje Barrettovog jednjaka i strikturu jednjaka u odnosu na one koji su HP negativni.⁵

Imunohistokemijski biljezi

MUC2 – glikoprotein je protein koji pripada obitelji mucina, a produciraju ga epitelne stanice na svojoj površini zbog čega se ponašaju kao fiziološka barijera protiv ozljede površinskog sloja stanice. Kodiran je genom MUC2. Postoji devet različitih gena epitelnih mucina (MUC – 1, 2, 3, 4, 5AC, 5B, 6, 7 i 8), od kojih je za ovu studiju MUC2 od posebnoga značaja. U normalnom tkivu, MUC2 nalazi se u citoplazmi vrčastih (*goblet*) stanica, uključujući: tanko crijevo, kolon, bronh, žlijezde slinovnice, te konjunktivu oka, a ne nalazi se u normalnoj sluznici želuca. Sekrecija mucina potaknuta je prašinom, dimom, raznim virusima, bakterijama itd.

U kontekstu proučavanja malignih oboljenja pozitivan nalaz MUC2 zabilježen je u:

- a) primarni gastrointestinalni tumori kolona, želuca i ezofagusa;
- b) vrčaste stanice u metastatskom tkivu kolo-rektalnoga karcinoma u ovarij, ali ne i u primarnom mucinoznom adenokarcinomu ovarija;
- c) intestinalna metaplazija (IM) ezofagusa (BJ), gdje je prikazana ekspresija MUC2 u vrčastim stanicama⁶⁻¹⁰

Slijedom navedenoga postavljaju se pitanja: je li MUC2 At prediktivni biljeg za regresiju BJ-a u bolesnika liječenih IPP-om, APK-om i/ili kombiniranom terapijom; je li njegova prisutnost povezana s progresijom u displaziju, te postoji li ekspresija istoga gena u oboljelih od adenokarcinoma jednjaka.

VEGF – vaskularni je endotelni faktor rasta, signalni protein uključen u proces vaskulogeneze (*de novo* formiranje embriogenog sustava cirkulacije), te angiogeneze (rast krvnih žila iz postojeće vaskulature). Dio je sustava koji osigurava opskrbu tkiva kisikom kada je cirkulacija krvi neadekvatna. Normalna je funkcija VEGF-a stvaranje novih krvnih žila za vrijeme embriogeneze, nakon ozljeda, kod pojačanog mišićnoga rada, te stvaranje kolateralnih krvnih žila kod oštećenja cirkulacije. Tumori koji mogu producirati VEGF mogu i metastazirati. VEGF se vezuje za receptor tirozin kinazu koja se nalazi na površini stanice, te je aktivira za proces angiogeneze.

Produkcija VEGF-a inducirana je u stanicama koje nemaju dovoljno kisika. Kada stanici nedostaje kisik, ona proizvodi hipoksija inducibilni faktor (HIF) koji stimulira oslobađanje VEGF-a i njegovo vezivanje za receptor tirozin kinazu, kao preduvjet za početak angiogeneze.¹¹⁻¹⁴ Nadalje, ekspresija VEGF-a, kao jednog od najpotentnijih izvora angiogeneze, već je dokazana kao bitan čimbenik u stvaranju vaskularne mreže kod rasta i metastaziranja tumora u različitim i brojnim tumorima koji se javljaju u ljudskoj populaciji, kao što su: karcinom dojke, jetre, debeloga crijeva, želučani adenokarcinom i planocelularni karcinom jednjaka.¹⁴

U zdravom jednjaku (uzimajući u obzir čitavu debljinu zida) VEGF se može naći u normalnom mijenteričkom pleksusu, u glatkim mišićima stanica u muskularis mukozi, muskularis propriji, te u mišićnom zidu arterija i vena. Endokrine stanice metaplastički promijenjene mukoze pokazuju ekspresiju VEGF-a unutar citoplazme.¹⁵

Ispitanici

Za uočavanje efekta od 0,8, uz razinu značajnosti 0,05 i snagu test 0,9, potrebna veličina uzorka je 34 ispitanika po skupinama.

U kliničko istraživanje uključeno je 36 bolesnika životne dobi 18-80 godina s refluksnim smetnjama, a bili su obrađeni u gastroenterološkoj ambulanti Opće bolnice Zadar u okviru svakodnevne gastroenterološke obrade bolesnika.

Ispitanici su sačinjavali skupinu od 36 žena i muškaraca životne dobi 18-80 godina s refluksnim smetnjama i dokazanim postojanjem Barrettovog jednjaka ili adenokarcinoma jednjaka.

Kontrolnu skupinu činili su isti ispitanici kod kojih se ponovio protokol pretraga nakon provedene adekvatne terapije po smjernicama.

Uključni kriteriji: ispitanici oba spola u dobi 18-80 godina bez otprije poznate maligne bolesti; ispitanici s pozitivnim refluksnim simptomima; ispitanici koji nemaju antikoagulantnu terapiju, a kod kojih je potvrđeno postojanje promjena na sluznici EG-spoja u smislu postojanja BJ-a ili adenokarcinoma.

Isključni kriteriji: bolesnici koji su mlađi ili stariji od gore navedenih, koji u anamnezi imaju podatak o ranijem malignom oboljenju, koji su već liječeni IPP-om zbog GERB-a, a bez prethodno učinjene EGD; ispitanici na antikoagulantnoj terapiji, te ispitanici koji ne razumiju upitnik.

Metode

U istraživanju su sudjelovali ispitanici u kojih je PHD-analizom dokazano postojanje Barrettovog jednjaka, adenokarcinoma, te isti ispitanici nakon provedene terapije Barrettovog jednjaka IPP-om, i/ili APC-om, radiofrekventnom ablacijom (RFA), endoskopskom mukoznom resekcijom (EMR), odnosno nakon ezofagektomije (oboljeli od adenokarcinoma). Ispitanicima se uzela anamneza i status, UZV abdomena, ispunjen je upitnik o GERB-u, te je učinjena ezofagogastroduodenoskopija s uzimanjem bioptičkih uzoraka na mjestu ezofagogastričnog spoja koja se ponovila EGD-om nakon terapije s uzimanjem bioptičkih uzoraka nad EG-spojem, odnosno kod operiranih bolesnika s mjesta anastomoze. Učinjena je PHD-analiza biopata na postojanje promjena koje odgovaraju Barrettovom jednjaku, uz određivanje MUC2 i VEGF-a, te utvrđivanje postojanja bakterije *Helicobacter pylori*. Patohistološko-imunohistokemijska analiza obavljena je na Odjelu za patologiju i sudsku medicinu Opće bolnice Zadar, na uređaju DAKO s kitovima i antitijelima od istog proizvođača : kit EnVISION FLEX HIGH pH, MO A-Hu MUC2, clone CCP58, te VEGF Clone: VG1, Isotype: IgG1 kappa; te kitMO A-HU VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Istraživanje je u cijelosti provedeno u skladu s etičkim principima Helsinške deklaracije. Ispitanici su popunili GERB upitnik koji je izradilo Hrvatsko gastroenterološko društvo, te su potpisali informirani pristanak.

Imunohistokemijska analiza MUC2

U laboratoriju za imunohistokemiju Odjela za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Opće bolnice Zadar iz parafinskog bloka tumorskoga tkiva izrezani su preparati debljine 3-4 μm , te montirani na silanizirane predmetnice. Nakon rezanja grijani su u termostatu na 60°C sat vremena, nakon čega su bojani primjenom neizravne imunohistokemijske metode bez biotina, koristeći Ultra View Universal DAB Detection kit marke Ventana. Daljnji postupci koji su potrebni za izvođenje imunohistokemijske analize izvedeni su potpuno automatizirano na platformi Ventana BenchmarkGX po sljedećem protokolu:

Deparafinizacija:

Na preparate se aplicira sistemska otopina EZ prep, nakon čega se preparati zagrijavaju na 75°C, inkubacija traje 16 minuta, ispiranje TRIS-puferom.

Razotkrivanje antigena:

Na preparate se aplicira sistemska otopina CC1 (TRIS/BORAT/EDTA PUFER pH 8,4), preparati se zagrijavaju na 95°C, inkubacija traje 30 minuta, hlađenje na 37°C, ispiranje TRIS-puferom.

Blokiranje endogene peptidaze:

Na preparate se aplicira H₂O₂, inkubacija traje 4 minute, ispiranje TRIS-puferom.

Aplikacija primarnog protutijela:

Na preparate je aplicirano primarno monoklonalno, mišje protutijelo MUC2 Clone CCP58 marke DAKO razrijeđeno diluentom u omjeru 1:50, inkubacija traje 30 minuta, ispiranje TRIS-puferom.

Aplikacija sekundarnog protutijela:

Na preparate se aplicira multimer, odnosno koktel sekundarnih protutijela na koja su vezani enzimi HRP (horseradish peroksidaza), inkubacija traje 8 minuta.

Vizualizacija:

Kompleks antigen/primarno protutijelo/sekundarno protutijelo (multimer HRP) vizualizira se apliciranjem supstrata H₂O₂, te kromogena 3,3 diaminobenzidin tetra klorid DAB, inkubacija traje 8 minuta.

Poboljšanje intenziteta obojenja:

Na preparate se aplicira UV Copper (metal za pojačavanje intenziteta obojenja), inkubacija traje 4 minute, ispiranje TRIS-puferom.

Kontrastno bojanje učinjeno je hematoksilinom. Preparati su dehidrirani u rastućem gradijentu alkohola, bistreni u ksilolu, te pokriveni filmom za pokrivanje histoloških preparata.

Kao pozitivna kontrola za MUC2 korišteno je tkivo debeloga crijeva.

Nalaz se tumačio na sljedeći način: 0 - bez bojanja stanica, + 1 ako je došlo do bojanja najmanje 30% stanica, + 2 ako je došlo do bojanja 31-60% stanica, a + 3 ako je došlo do bojanja više od 60% stanica.¹⁶

Imunohistokemijska analiza VEGF

U laboratoriju za imunohistokemiju Odjela za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Opće bolnice Zadar iz parafinskog bloka tumorskoga tkiva izrezani su preparati debljine 3-4 μm , te montirani na silanizirane predmetnice. Nakon rezanja grijani su u termostatu na 60 °C sat vremena nakon čega su bojani primjenom neizravne imunohistokemijske metode bez biotina koristeći UltraView Universal DAB Detection kit marke Ventana. Daljnji postupci koji su potrebni za izvođenje imunohistokemijske analize

izvedeni su potpuno automatizirano na platformi Ventana BenchmarkGX po sljedećem protokolu:

Deparafinizacija:

Na preparate se aplicira sistemska otopina EZ prep, nakon čega se preparati zagrijavaju na 75 °C, inkubacija traje 16 minuta, ispiranje TRIS-puferom.

Razotkrivanje antigena:

Na preparate se aplicira sistemska otopina CC1 (TRIS/BORAT/EDTA PUFER pH 8,4), preparati se zagrijavaju na 95°C, inkubacija traje 60 minuta, hlađenje na 37°C, ispiranje TRIS-puferom.

Blokiranje endogene peptidaze:

Na preparate se aplicira H₂O₂, inkubacija traje 4 minute, ispiranje TRIS-puferom.

Aplikacija primarnog protutijela:

Na preparate je aplicirano primarno monoklonalno, mišje protutijelo Vascular Endotelial Growth Factor Clone VG1 marke DAKO razrijeđeno diluentom u omjeru 1 : 30, inkubacija traje 32 minute, ispiranje TRIS-puferom.

Aplikacija sekundarnog protutijela:

Na preparate se aplicira multimer, odnosno koktel sekundarnih protutijela, na koja su vezani enzimi HRP (horseradish peroksidaza), inkubacija traje 8 minuta.

Vizualizacija:

Kompleks antigen/primarno protutijelo/sekundarno protutijelo (multimerHRP), vizualizira se apliciranjem supstrata H₂O₂, te kromogena 3,3 diaminobenzidin tetra klorid DAB, inkubacija traje 8 minuta.

Poboljšanje intenziteta obojenja:

Na preparate se aplicira UV Copper (metal za pojačavanje intenziteta obojenja), inkubacija traje 4 minute, ispiranje TRIS-puferom.

Kontrastno je bojanje učinjeno hematoksinom. Preparati su dehidrirani u rastućem gradijentu alkohola, bistreni u ksilolu, te pokriveni filmom za pokrivanje histoloških preparata.

Kao pozitivna kontrola za VEGF korišteno je tkivo tonzile.

Nalaz se tumačio na sljedeći način: uzorci obojani anti-VEGF antitijelom su žuto-smeđe granule u citoplazmi stanica ili citoplazmatskoj membrani. Negativan uzorak je onaj u kojemu je manje od 30% stanica sadržavalo VEGF, a pozitivan ukoliko je 31 – 100% stanica imalo VEGF.^{12,13}

Rezultati

Opis uzorka

U ispitivanju je sudjelovalo ukupno 36 žena i muškaraca (od toga 19 žena i 17 muškaraca), prosječne dobi 60,6 godina za žene i 59,8 godina za muškarce. Medijan njihove dobi iznosio je 61 godinu (raspon 34-82; donji kvartil 50; gornji kvartil 70). U ukupnom uzorku bilo je 10 (27,78%) ispitanika koji su izjavili da su pušači i 8 (22,22%) koji su izjavili da piju alkohol. Podatke za drugi pregled imamo za 32 ispitanika, s obzirom na to da je njih četvero koji su na prvom pregledu imali dijagnozu karcinoma operirano i za koje nema podataka o drugom pregledu (učinjena je ezofagektomija). Raspon između dvaju pregleda iznosio je u prosjeku 24,5 mjeseci (raspon 3-69 mjeseci; donji kvartil 7,5, a gornji kvartil 41). U Tablici 1 prikazana je distribucija ispitanika s obzirom na dijagnozu.

Tablica 1. Distribucija ispitanika s obzirom na dijagnozu

Table 1 Distribution of the respondents considering to the diagnosis

Klinička dijagnoza <i>Clinical diagnosis</i>	1. pregled <i>1st examination</i>	2. pregled <i>2nd examination</i>
	N (%)	N (%)
GERB (1) <i>GERD (1)</i>	0	25 (69,445%)
BE (2)	32 (88,89%)	7 (19,445%)
CA (3)	4 (11,11%)	0
Operirani (4) <i>Operated (4)</i>	0	4 (11,11%)
Ukupno <i>Total number</i>	36 (100%)	36 (100%)

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest; BE – Barrett ezofagus; CA – karcinom

GERD – gastroesophageal reflux disease; BE – Barrett's esophagus; CA – carcinoma

Provjerili smo statističku značajnost ove promjene testom-predznaka (sign-test), a on je pokazao značajnu promjenu ($Z = 4,233$, $p = 0,000$).

Izraženost MUC2 i VEGF-a u tkivu sluznice oboljelih od adenokarcinoma jednjaka

U ovoj je skupini četvero ispitanika koji su operirani: jedan je na prvom pregledu imao MUC2

od 0, dva su imala MUC2 u kategoriji 1-30% , a jedan u kategoriji 31-60%. Što se tiče kategorije VEGF-a na prvom pregledu kod ovih četvero bolesnika situacija je ista: jedan je imao VEGF od 0, dva su imala VEGF u kategoriji 1-30%, a jedan je imao VEGF u kategoriji 31-60%.

MUC2

U analizi su ispitanici s karcinomom (CA) uzeti kao bolesni (pozitivan nalaz), a oni s BJ-om kao zdravi (negativan nalaz). Izraženost MUC2 definirana je kao pozitivna, ukoliko je bila veća od 0%, a kao negativna ako je bila 0%.

Tablica 2. Kontingencijska tablica s izraženošću MUC2 i vrstom oboljenja (razlikovanje BJ-a od CA)
Table 2 Contingency table with MUC2 expression and type of disease (differentiation of BE from CA)

Oboljenje Disease	MUC2		Ukupno Total number
	Pozitivno (> 0%) Positive (> 0%)	Negativno (0%) Negative (0%)	
CA (pozitivno) CA (positive)	3	1	4
BE (negativno) BE (negative)	14	18	32
Ukupno Total	17	19	36

MUC 2 – mucinozni glikoprotein, CA – karcinom
MUC 2 – Glycoprotein mucinosum, CA – carcinoma

Fisherovim egzaktnim testom provjerena je valjanosti parametra MUC2 za razlikovanje BJ-a od CA, međutim nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p = 0,259$).

VEGF

I u sljedećoj analizi su ispitanici s karcinomom (CA) uzeti kao bolesni (pozitivan nalaz), a ispitanici s BJ-om kao zdravi (negativan nalaz). Izraženost VEGF-a definirana je kao pozitivna ukoliko je bila veća od 0%, a kao negativna ako je bila 0%.

Tablica 3. Kontingencijska tablica s izraženošću VEGF-a i vrstom oboljenja (razlikovanje BJ-a od CA)
Table 3 Contingency table with VEGF expression and type of disease (differentiation of BE from CA)

Oboljenje Disease	VEGF		Ukupno Total number
	Pozitivno (> 0%) Positive (> 0%)	Negativno (0%) Negative (0%)	
CA (pozitivno) CA (positive)	3	1	4
BE (negativno) BE (negative)	26	6	32
Ukupno Total	17	19	36

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta; CA – karcinom, BE – Barrettov jednjak

VEGF – vascular endothelial growth factor, BE – Barrett's esophagus; CA – carcinoma

Fisherovim egzaktnim testom provjerena je valjanosti parametra VEGF-a za razlikovanje BJ-a od CA, međutim ni u ovom slučaju nije dobivena statistički značajna vrijednost ($p = 0,597$).

Probir nakon prve EGD

Kirurški pristup

Nakon prve EGD, adenokarcinom je dijagnostičiran u jedne žene u dobi 56 god. i jedne u dobi od 36 god., te u dva muškarca u dobi 55 i 50 god. Kod svih četvero oboljelih učinjena je totalna ezofagektomija s ezofagogastroanastomozom. Kontrolne EGD, radiološke, te laboratorijske pretrage su uredne. Bolesnici se prate posljednjih 6 godina i svi su bez propagacije osnovne bolesti.

Fisherovim egzaktnim testom usporedili smo izraženost HP-a između CA (pozitivnih) i BJ (negativnih) ispitanika, te smo dobili zanimljiv rezultat. Naime, Fisherov egzaktni test pokazao se značajnim ($p = 0,017$), što znači da se na osnovu izraženosti bakterije HP na sluznici jednjaka može razlikovati ispitanike s CA i one s BJ-om – oni s CA imaju manju izraženost HP-a. Kako je već naglašeno, iako je značajno, ovaj nalaz treba interpretirati s oprezom jer smo imali samo četiri ispitanika s CA.

Tablica 4. Kontingencijska tablica CA i BJ-a ispitanika s obzirom na izraženost bakterije HP
 Table 4 Contingency table of CA and BE subjects considering to the expression of HP bacteria

Oboljenje <i>Disease</i>	HP bakterija <i>HP bacteria</i>		Ukupno <i>Total number</i>
	Pozitivno (> 0%) <i>Positive</i> (> 0%)	Negativno (0%) <i>Negative</i> (0%)	
CA (pozitivno) <i>CA</i> (<i>positive</i>)	0	4	4
BE (negativno) <i>BE</i> (<i>negative</i>)	22	10	32
Ukupno <i>Total number</i>	22	14	36

HP – *Helicobacter pylori*, CA – karcinom, BE – Barrettov jednjak

HP – *Helicobacter pylori*, CA – carcinoma; BE – Barrett's esophagus

Diskusija

Zadarska županija ima oko 170 000 stanovnika. U gastroenterološkoj ambulanti se na godišnjoj razini učini između 3000–3500 ezofagogastroduodenoskopija. Pozitivan nalaz GERB-a je čest; nalazi se u oko 20 – 25 % pregledanih, a od toga se broja BJ na godišnjoj razini dijagnosticira u svega nekoliko oboljelih. Podaci iz dostupne literature,^{4,5} ukazuju na činjenicu kako se za vrijeme EGD-a, bolest dijagnosticira u 6 – 12% pregledanih. Mogući uzroci ovog subdijagnosticiranja leže u sljedećem: nedovoljno pažljivo analiziranje EG-spoja, odnosno "brzi prolaz" kroz jednjak; rijetko uzimanje bioptičkih uzoraka zbog subjektivnog osjećaja nelagode bolesnika (nisu sedirani!), te velike pokretljivosti jednjaka (otežano uzimanje adekvatnog uzorka); uzimanje uzoraka koji nisu sa samoga spoja nego su najčešće želučani.

Provjera učinjena Fisherovim egzaktnim testom (2*2 kontingencijske tablice) nije pokazala značajnost razlike izraženosti MUC2 ($p = 0,259$) i VEGF-a ($p = 0,597$) u tkivu sluznice oboljelih od adenokarcinoma jednjaka i onih oboljelih od BJ-a (Tablice 2 i 3) Fisherov egzaktni test nije se pokazao

značajnim, što znači da na osnovu parametra MUC2 ne možemo razlikovati ispitanike s CA-om i one s BJ-om. Razlog leži u činjenici da je MUC2 zastupljen u vrčastim stanicama koje se nalaze i kod BJ-a i kod CA-a.¹⁷

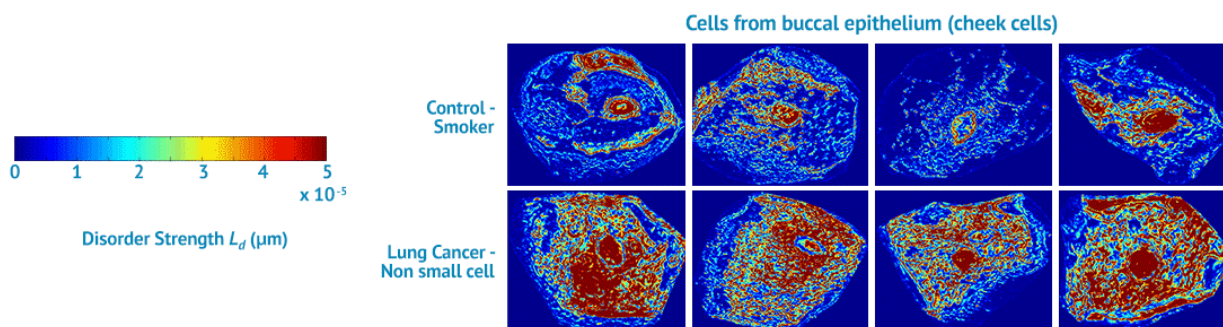
Dovodeći u vezu VEGF s oboljelima od CA i BJ-a Fisherovim egzaktnim testom također se nije pokazala statistička znakovitost, što znači da na osnovu parametra VEGF-a ne možemo razlikovati one s CA-om i one s BJ-om. Razlog ovakvom nalazu možemo obrazložiti činjenicom da je prisutnost VEGF-a zabilježena i u BJ i u CA jednjaka.¹⁸ Couvelard A i sur.¹⁸ dokazali su da je ekspresija VEGF-a u korelaciji s vaskularizacijom, ali nema neovisnu prognostičku vrijednost. Za pretpostaviti je da je uzorak od četiri ispitanika ipak bio malen da bi se sa sigurnošću moglo zaključiti kako izražajnost MUC2 i VEGF-a nije bila značajna. Ova će se teza morati ispitati na većem broju ispitanika, te bi je valjalo provjeriti u budućim studijama.

Budući je u izvornoj studiji sudjelovalo 36 ispitanika, učinjena je statistička analiza o izraženosti MUC2 i VEGF-a u sluznici s i/ili bez IM i/ili D. Ovom analizom nisu obuhvaćeni oboljeli od karcinoma, jer su svi oboljeli operirani u drugim centrima, te stoga nismo mogli učiniti analizu na tumorskom tkivu nakon operacije. U primarnim biopsijama patolog nije opisivao postojanje intestinalne metaplazije i/ili displazije u tumorskom tkivu, nego je cijela analiza bila fokusirana na tumorske stanice i uobičajenu imunohistokemijsku analizu kod ove bolesti (cytokeratin-20, HER-2, bcl-2 itd.). Ovo je prikaz rezultata oboljelih od BJ (32 ispitanika):

Fisherovim egzaktnim testom usporedili smo izraženost MUC2 između D-pozitivnih i D-negativnih ispitanika, zatim razliku u izraženosti VEGF-a između D-pozitivnih i D-negativnih, te razliku u izraženosti *Helicobacter Pylori* (HP), ali u niti jednoj učinjenoj analizi između D-pozitivnih i D-negativnih ispitanika nismo dobili statistički značajan rezultat. Razlog vjerojatno leži u malom uzorku ispitanika koji su imali pozitivan nalaz displazije.

Potom smo istim testom usporedili izraženost MUC2 između IM-pozitivnih i IM-negativnih ispitanika, potom razliku u izraženosti VEGF-a između IM-pozitivnih i IM-negativnih, te razliku u izraženosti HP-a između IM-pozitivnih i IM-negativnih, ali niti u ovim analizama nismo dobili statistički značajan rezultat, odnosno, nema razlike u izraženosti MUC2, VEGF i HP između IM-pozitivnih i IM-negativnih ispitanika.

Imunohistokemijski rezultati podudaraju se sa statističkim podacima: pozitivan nalaz MUC2 i VEGF-a,



Slika 1. / Picture 1.

Preuzeto sa: <http://nano-cytomics.com/technology/>

nije bio uzročno-posljedično vezan uz viši stupanj displazije i/ili metaplazije, niti je bio vezan uz češću pojavnost pozitivnog nalaza na bakteriju HP, nego je bio jasan pokazatelj postojanja IM i/ili displazije.

Potrebno je provoditi intenzivnu edukaciju osoblja, koristiti dodatne mogućnosti analize sluznice koje su nam dostupne na endoskopu (Narrow Band Imaging – NBI), te ciljano biopiranje, sedacija bolesnika kada je to moguće. Možda je budućnost u *brush*-tehnikama s četkicama koje imaju čvršća i duža vlakna koja dublje prodiru u tkivo, pritom zahvaćajući veću površinu, kako bi se dobio adekvatan uzorak za analizu citologa. Sam zahvat izveo bi se u kraćem razdoblju, što nije zanemarivo. Tako bi se izbjegle moguće komplikacije nakon multiplih biopsija EG-spoja (mikroperforacije, krvarenja i sl.). Na tom se tragu razvija nanocitologija¹⁹ – tehnika kojom se novim suvremenim optičkim instrumentima mogu prikazati promjene na stanicama koje su predmet istraživanja, a koje do sada nije bilo moguće vidjeti. Ovom se tehnikom mogu detektirati nanoarhitekturne alternacije u istraživanoj stanici (Slika 1). Tehnika se počela primjenjivati u ranoj detekciji karcinoma pluća obriskom bukalne sluznice, te analizom obriska kolonocita u ranoj detekciji kolorektalnog karcinoma.¹⁹

Zaključak

MUC 2 pozitivnost je karakteristična za vrčaste stanice Barrettovog jednjaka, ali nije jedini biomarker. VEGF je pokazatelj angiogeneze u mukozni oboljelih od Barrettovog jednjaka, sa i/ili bez IM i DY niskoga stupnja. Uloga H Pylori je protektivna na sluznici jednjaka.

Ukupno, ova studija upućuje na potrebu češćeg uzimanja bioptičkih uzoraka s EG spoja i kod ispitanika s minimalnim endoskopskim promjenama na sluznici, te se uz klasičnu patohistološku analizu

pokazala korist u dopuni obrade uvođenjem imunohistokemijske analize MUC2 i VEGF-a, kao pokazatelja mogućeg razvoja karcinoma. Terapija inhibitorima protonske pumpe je i dalje osnova u liječenju, uz uvođenje i razvoj ablativnih tehnika, kao što su APK, RFA, EMR.

Literatura

1. Pulanić R. Gastroezofagelana refluksna bolest. U: Vucelić B, urednik. Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 395-408.
2. Sleisenger and Fordtran' s Gastroesophageal Reflux disease and It 's Complications. U: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, urednici. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8 izd. Philadelphia: Saunders; 2006, str. 921-30.
3. Garud SS, Keilin S, Cai Q, Willingham FF. Diagnosis and management of Barrett's esophagus for the endoscopist. Therap Adv Gastroenterol. 2010;3: 227-38.
4. Harrison. Mučnina, povraćanje i probavne tegobe. U: Ivančević Ž. Principi interne medicine, Split: Placebo d.o.o., 2008; str. 200.
5. Lippincott, Williams et Wilkins. Medical Management of Malignant Disease. U: Lippincott, Williams et Wilkins The Washington Manual of Medical Therapeutics. 31 izd. St.Louis, Missouri; str. 444.
6. 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. 2007;142:540-4.
7. McIntire MG, Soucy G, Vaughan TL, Shahsafaei A, Odze RD. MUC2 is a highly specific marker of goblet cell metaplasia in the distal esophagus and gastroesophageal junction. Am J Surg Pathol. 2011; 35:1007-13.
8. Szachnowicz S, Cecconello I, Ribeiro U, et al. Mucin pattern reflects the origin of the adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a retrospective clinical and laboratorial study. World J Surg Oncol. 2009;7:27.

9. Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298:G571-81.
10. Yuan J, Hernandez JC, Ratuapli SK, et al. Prevalence of buried Barrett's metaplasia in patients before and after radiofrequency ablation. *Endoscopy.* 2012;44:993-7.
11. Moriyama N, Amano Y, Mishima Y, et al. What is the clinical significance of stromal angiogenesis in Barrett's esophagus? *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23 Suppl 2:S210-5.
12. Vascular endothelial growth factor [Internet]. [citirano 11. studenog 2013.] Dostupno na adresi: <http://en.wikipedia.org/wiki>.
13. Qu W, Fu JD, Yang F, et al. Clinical implications of PTEN and VEGF expression status, as well as microvessel density in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2015;10:1409-15.
14. Maley CC. Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Cancer Lett.* 2007;245:22-32.
15. Steininger H, Pfofe DA, Müller H, Haag-Sunjic G, Fratianu V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract.* 2005;201:573-7.
16. Türkmen IÇ, Başsüllü N, Uraz S, Yerdel MA, Memişoğlu R, Bülbül Doğusoy G. CDX2, COX2 and MUC2 expressions in Barrett's esophagus: can they be useful in determination of the dysplasia? *Turk Patoloji Derg.* 2012;28:251-8.
17. Fiocca R, Villani L, Tenti P, et al. Characterization of four main cell types in gastric cancer: foveolar, mucopeptic, intestinal columnar and goblet cells. An histopathologic, histochemical and ultrastructural study of "early" and "advanced" tumours. *Pathol Res Pract.* 1987;182:308-25.
18. Couvelard A, Paraf F, Gratio V, et al. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol.* 2000; 192:14-8.
19. Fasanella KE, Bista RK, Staton K, et al. Nuclear nano-architecture markers of gastric cardia and upper squamous esophagus detect esophageal cancer "Field Effect". *J Cancer.* 2013;4:626-34.