

Naturalny rozwój przełyku Barretta i raka gruczołowego przełyku w doświadczalnych modelach choroby refluksowej przełyku

Natural development of Barrett's oesophagus and adenocarcinoma in experimental models of gastroesophageal reflux disease

Rafał Pabiańczyk, Jolanta Majka, Danuta Drozdowicz, Katarzyna Urbańczyk, Tomasz Brzozowski

Katedra Fizjologii Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* w Krakowie

Przegląd Gastroenterologiczny 2011; 6 (3): 176–186

DOI: 10.5114/pg.2011.22802

Słowa kluczowe: przełyk Barretta, gruczolakorak, refluks żołądkowo-dwunastniczy.

Key words: Barrett's oesophagus, adenocarcinoma, gastroesophageal reflux.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. Tomasz Brzozowski, Katedra Fizjologii, Uniwersytet Jagielloński *Collegium Medicum*, ul. Grzegorzewska 16, 31-531 Kraków, tel. +48 12 421 10 06, faks +48 12 422 20 14, e-mail: mpbrzozo@cyf-kr.edu.pl

Streszczenie

Wstęp: Do rozwoju choroby refluksowej (*gastroesophageal reflux disease* – GERD) dochodzi w momencie zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami drażniącymi refluksatu a czynnikami ochraniającymi błonę śluzową przełyku. Przewlekły stan zapalny przełyku może doprowadzać do poważnych powikłań w postaci metaplazji Barretta i w konsekwencji rozwoju raka przełyku. W ostatnich latach stwierdza się coraz częstsze występowanie refluksu jelitowo-żołądkowego powikłanego rozwojem gruczolakoraka przełyku, zwłaszcza w krajach o wysokim rozwoju cywilizacyjnym.

Cel: Podjęcie próby stworzenia przewlekłych modeli refluksu przełykowego, które naśladują tę patologię u człowieka, w celu badania mechanizmu powstawania uszkodzeń przełykowych, ich porównanie oraz ocena przydatności do prowadzenia badań nad wieloetapowym procesem nowotworzenia bez zastoso-

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano grupę 90 szczurów rasy Wistar płci mieszanej. Eksperyment przeprowadzono w trzech zasadniczych grupach badawczych, w których wykonano: A – połączenia przełykowo-dwunastnicze bok przełyku do boku dwunastnicy, B – połączenie przełykowo-dwunastnicze koniec przełyku do boku dwunastnicy i C – połączenie przełykowo-dwunastnicze koniec przełyku do boku dwunastnicy wraz z całkowitą resekcją żołądka. Dwa pierwsze typy operacji (grupy A, B) charakteryzował refluks treści mieszanej dwunastniczo-żołądkowej, a w trzecim typie zabiegu (grupa C) uzyskano refluks treści wyłącznie alkalicznej do przełyku.

Wyniki: We wszystkich trzech grupach zoperowanych zwierząt po 1–3 mies. od zabiegu obserwowano zmiany morfologiczne

Abstract

Introduction: Development of gastroesophageal reflux disease (GERD) takes place when the balance between irritant and protecting mucous membrane mechanisms is impaired. The chronic inflammation of the oesophagus results in serious complications including Barrett's metaplasia progression into esophageal adenocarcinoma. In the last few years the incidence of chronic gastroesophageal reflux disease has been increasing, especially in highly developed countries, and this chronic disease may result in the development of oesophageal adenocarcinoma, which is also observed with increased frequency.

Aim: Creation and comparison of chronic gastroesophageal reflux disease models, as well as estimation of their suitability for the investigation of the process of natural carcinogenesis in the oesophagus.

Material and methods: Ninety Wistar rats were used for the study on development of chronic oesophageal inflammation. Three major groups, A – side to side anastomosis, B – side to end anastomosis and C – side to end anastomosis with total gastrectomy, were selected. In each group a different operation technique was performed to induce chronic oesophageal reflux. Groups A and B were characterized by mixed gastroduodenal reflux while group C included animals with only alkaline reflux.

Results: In all three experimental models of GERD the morphological changes of the oesophageal mucosa were observed by gross inspection starting 1 month after the surgery. Under microscopic investigation chronic inflammation of the oesophageal mucosa progressing to Barrett's metaplasia and in some cases to cancer was also confirmed.

Conclusions: All experimental animal models developed due to GERD are highly reproducible and exhibit low mortality.

struktury przełyku w postaci pogrubienia błony śluzowej przełyku, nadżerek i owrzodzeń, które były wyraźnie widoczne już podczas oceny makroskopowej. W badaniu mikroskopowym u większości zwierząt stwierdzono przewlekły stan zapalny, metaplastazję Barretta oraz gruczolakoraka przełyku.

Wnioski: Wykonane modele doświadczalnego refluksu jelitowo-żołądkowo-przełykowego cechuje duża powtarzalność obserwacji, znikoma śmiertelność zwierząt, a uzyskane w ten sposób zmiany morfologiczne naśladują kliniczny charakter choroby. Zmiany te powstają wyłącznie na drodze naturalnego rozwoju, bez interwencji farmakologicznej w postaci np. podawania substancji kancerogennych. Opracowane modele pozwalają na systematyczne prowadzenie badań w stosunkowo długim czasie, co umożliwi poznanie patogenezы uszkodzenia przełyku, mechanizmów kancerogenezy w przebiegu GERD oraz ewentualnych sposobów zapobiegania rakowi przełyku na podłożu metaplastazji Barretta.

Wstęp

Choroba refluksowa (*gastroesophageal reflux disease* – GERD) jest najczęstszą chorobą przełyku. Niewielkie okresowe zarzucanie do przełyku żołądkowo-jelitowej treści pokarmowej występuje u każdego człowieka i nie powoduje dolegliwości czy zmian w błonie śluzowej. O GERD mówi się wówczas, gdy dochodzi do przetłumienia mechanizmów obronnych, które w warunkach normalnych zapobiegają rozwojowi choroby. Zaburzona zostaje równowaga pomiędzy mechanizmami ochraniającymi i czynnikami drażniącymi obecnymi w treści żołądkowo-jelitowej, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego błony śluzowej przełyku. Chroniczne zapalenie i wieloletni wywiad GERD może w konsekwencji doprowadzić do poważnych powikłań zagrażających życiu chorego [1]. Początkowym etapem powikłań GERD jest metaplastazja jelitowa, w której stwierdza się obecność nabłonka jelitowego zastępującego nabłonek wielowarstwowy płaski. Kolejnym stadium transformacji nowotworowej jest dysplazja niskiego i wysokiego stopnia, a w konsekwencji rozwój raka przedinwazyjnego oraz inwazyjnego przełyku.

W ostatnich latach coraz częściej notuje się przypadki wystąpienia refluksu jelitowo-żołądkowego, dotyczy to przede wszystkim krajów o wysokim rozwoju cywilizacyjnym, tj. mieszkańców Ameryki Północnej i Europy Zachodniej, w tym Polski. Liczba stwierdzonych przypadków zwiększa się również w krajach azjatyckich [2]. Zapadalność na GERD ocenia się na ok. 85 zachorowań na 100 tys. mieszkańców rocznie, a częstość występowania wynosi 5% i stale wzrasta [3–5].

Refluks przełykowy w wielu przypadkach powoduje znaczne pogorszenie jakości życia chorych. Mimo tego u części pacjentów przebieg schorzenia jest bezobjawowy i nie informują oni o żadnych dolegliwościach, nie będąc świadomymi choroby [1]. Długotrwała ekspozycja

Macroscopic and microscopic assessment of oesophageal inflammation that developed in response to experimental reflux confirmed that these models are suitable and useful for determination of the pathogenesis of Barrett's related oesophageal cancer.

śluzówki przełyku na kontakt z treścią żołądkową i utrzymujące się zapalenie sprzyja uszkodzeniu komórek błony śluzowej, doprowadzając w konsekwencji do zastąpienia nabłonka wielowarstwowego płaskiego przez nabłonek walcowaty z obecnością komórek kubkowatych (metaplastazja jelitowa). Zmiany takie określa się mianem przełyku Barretta (*Barrett's esophagus* – BE). Choroba refluksowa jest ustalonym czynnikiem ryzyka BE [6]. Obszary lokalnej metaplastazji jelitowej są obciążone wysokim prawdopodobieństwem powstania komórek z dużym potencjałem nowotworowym. Obecnie wielu autorów stan ten określa jako najwyższy stopień zaawansowania GERD. Występowanie w błonie śluzowej przełyku metaplastycznych komórek typu jelitowego sprzyja rozwojowi gruczolakoraka (*esophageal adenocarcinoma* – EAC) i dlatego BE uważa się klinicznie za stan przednowotworowy. Nabłonek BE podlega ciągłej odnowie i jego stała ekspozycja na pulsacyjne działanie refluksatu najprawdopodobniej zmienia transdukcję sygnałną kierującą procesem proliferacji i różnicowania komórek. Przełyk Barretta jest stanem odwracalnym, utrzymywanie się jednak stanu zapalnego w przebiegu GERD może nasilać przechodzenie BE w EAC [7].

Zapadalność na EAC zwiększa się w znacznie szybszym tempie w porównaniu z utrzymującą się na stałym poziomie zapadalnością na raka płaskonabłonkowego przełyku [2]. Ponadto liczba zanotowanych przypadków EAC w ostatnich latach wzrasta bardziej dynamicznie niż innych nowotworów przewodu pokarmowego [8]. U osób z rozległą metaplastazją jelitową (nieprawidłowy nabłonek na odcinku dłuższym niż 3 cm) ryzyko wystąpienia raka przełyku w stosunku do całej populacji zwiększa się 30–125-krotnie. Nowotwór stwierdza się już u ok. 10% chorych z rozpoznaniem BE [6]. Refluks nie tylko kwaśnej treści żołądkowej, ale szczególnie zasadowej treści dwunastniczej odgrywa ważną rolę w patoge-

nezie powstawania BE i sprzyja rozwojowi gruczolakoraka przełyku [4, 9–11]. Przewlekły refluks dwunastniczo-żołądkowo-przełykowy jest uznanym czynnikiem ryzyka rozwoju BE i gruczolakoraka. Rokowanie w EAC jest złe, chociaż wraz z rozwojem technik leczenia operacyjnego, chemo- i radioterapii prognozy przeżycia w przebiegu raka przełyku stopniowo się poprawiły. Obecnie 5-letni czas przeżycia dotyczy 10–15% chorych, co nie jest optymistycznym wynikiem, nawet w porównaniu z 4-procentową szansą przeżycia, jaką mieli chorzy na raka w latach 70. XX w. [12–17].

Profilaktyka GERD najczęściej polega na stosowaniu odpowiedniej diety, zmianie trybu życia, redukcji masy ciała, udawaniu się na spoczynek w pozycji z uniesionym tułowiem, ograniczeniu palenia tytoniu i spożycia alkoholu oraz ograniczeniu pokarmów bogatych w tłuszcze, które zmniejszają napięcie spoczynkowe dolnego zwieracza przełyku (*lower esophageal sphincter* – LES).

Lekami pierwszego wyboru są inhibitory pompy protonowej (IPP). Ich skuteczność wśród obecnie stosowanych farmaceutyków jest największa. Efektywnie i długotrwale hamują produkcję kwasu solnego w żołądku, zmniejszając tym samym potencjał drażniący refluksatu. Są szczególnie zalecane w chorobie przebiegającej ze znacznym nasileniem objawów. Lekiem drugiego wyboru są inhibitory receptora histaminowego H₂. Ich mechanizm działania w GERD polega również na zmniejszeniu poziomu wydzielania żołądkowego w celu zwiększenia protekcji błony śluzowej przełyku. Mimo możliwości farmakologicznych i potwierdzonej skuteczności leków z tych grup, GERD jest chorobą przewlekłą, nawracającą i wymagającą długotrwałej farmakoterapii [4]. Leczenie wspomagające i zalecane w przypadkach choroby o łagodniejszym przebiegu bez cech zapalenia przełyku to m.in. leki z grupy *antacida* zobojętniające kwas solny i leki prokinetyczne poprawiające kinetykę górnego odcinka przewodu pokarmowego. Ich skuteczność jest jednak nieznaczna, a w wielu sytuacjach kwestionowana, zwłaszcza w kontekście prokinetyków, ze względu na ich udowodnione działania niepożądane.

W przypadku małej skuteczności lub braku efektu leczenia farmakologicznego i w zależności od stopnia zaawansowania choroby możliwe jest leczenie chirurgiczne. Wykonuje się zabiegi antyrefluksowe, takie jak laparoskopowa funduplikacja sposobem Nissena (wytworzenie mankieta z dna żołądka otaczającego przełyk) czy też zabiegi endoskopowe (wytworzenie dodatkowych fałdów błony śluzowej w okolicach wpustu) [18].

W dotychczas przeprowadzonych eksperymentach opisano wiele rodzajów modeli ostrego zapalenia przełyku u zwierząt doświadczalnych. Naghama i wsp. opracowali jedną z metod wywoływania ostrego zapalenia

przełyku [19]. Metoda ta polega na podwiązaniu odźwiernika i części rezerwuarowej wpustu żołądka, co ułatwia zarzucanie treści do przełyku. Pierwsze uszkodzenia można zaobserwować po kilku godzinach. Tsuji i wsp. opracowali metodę krótkotrwałego podawania stężonego kwasu octowego na surowicówkę przełyku [20]. Metoda opracowana przez Omurę i wsp. [21] polega na założeniu podwiązki w zakresie opuszki dwunastnicy, co utrudnia pasaż treści pokarmowej i powoduje refluks przełykowy. W większości opisanych przypadków uzyskane zmiany mają charakter ostrych uszkodzeń błony śluzowej przełyku obserwowanych w ciągu dni lub tygodni po ich indukcji. W praktyce klinicznej przebieg GERD jest jednak przewlekły i najczęściej wieloletni. Ostatnio opracowano również kilka metod wywoływania przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej przełyku. Technika opracowana przez Nishijima i wsp. polega na wykonaniu całkowitej gastrektomii z zespoleniem końca przełyku z boczną ścianą jelita czczego w odległości 4 cm od więzadła Treitza [7]. Metodę polegającą na wykonaniu zespolenia końca przełyku z bokiem jelita czczego bez resekcji żołądka opracowali Lewrat i Clark [22–24]. Według Naito i wsp. [4] skutecznym sposobem badania mechanizmu uszkodzeń przełyku jest uzyskanie refluksu żołądkowo-dwunastniczego poprzez wykonanie zespolenia bocznej ściany przełyku z wolną boczną ścianą dwunastnicy. Opracowano także metody operacyjnej kaniulacji przełyku polegające na stałym wlewie substancji drażniących do światła przełyku [25].

Cel

Na podstawie doświadczeń własnych oraz opublikowanych badań dotyczących patologii BE podjęto próbę porównania trzech doświadczalnych modeli refluksu przełykowego, oceniając zmiany makroskopowe i mikroskopowe powstałe w błonie śluzowej przełyku oraz przydatność tych modeli do prowadzenia badań nad wieloetapowym procesem nowotworzenia bez zastosowania egzogennych kancerogenów.

Materiał i metody

Charakterystyka zwierząt doświadczalnych

Do badania wybrano grupę 90 białych szczurów rasy Wistar w wieku 7–10 tyg., ptci mieszanej, o masie ciała 200–250 g. Przed zabiegiem szczury przechowywano w metalowych klatkach w standardowych warunkach laboratoryjnych: temperatura powietrza 22 ± 3°C, wilgotność powietrza 55 ± 5%, w cyklach 12-godzinnych dzień/noc. Zwierzęta żywiono granulatem i nie ograniczono im dostępu do wody pitnej. Szczury aklimatyzo-

wano w powyższych warunkach przez 7 dni. Eksperyment przeprowadzono w trzech zasadniczych grupach badawczych A, B i C, różniących się wykonanym zabiegiem chirurgicznym w celu wywołania refluksu przełykowego (ryc. 1). W grupie A i B przy zachowanym żołądku uzyskano refluks treści mieszanej (żołądkowo-dwunastniczej), a w grupie C przy usuniętym żołądku uzyskano czysty refluks treści alkalicznej (dwunastniczej). Całokształt badań przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską i po pisemnej akceptacji Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Techniki zabiegów chirurgicznych

Zwierzęta głodzono przez 24 godz. przed zabiegiem, natomiast dostęp do wody ograniczono 4 godz. przed operacją. Zastosowano znieczulenie ogólne w postaci dootrzewnowej iniekcji pentobarbitalu w stężeniu 50 mg, w dawce 30–35 mg/kg m.c. Preparat zmieszano z solą fizjologiczną w proporcji 1 : 4 i aplikowano dootrzewnowo w objętości 0,8–1,2 ml powstałego roztworu w zależności od masy ciała zwierzęcia.

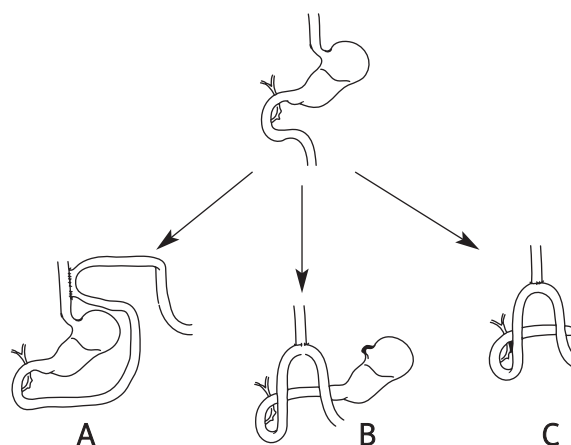
Pierwszy typ – zabieg A – polegał na wykonaniu zespolenia bok przełyku do boku dwunastnicy. Powłoki brzuszne przecięto w linii pośrodkowej ciała na odcinku ok. 3,5 cm, rozpoczynając cięcie od mostka do pępka (ostrze 15). Dostęp do przełyku uzyskano przez przecięcie więzadła wątrobowo-żołądkowego i po wypreparowaniu okolicznych tkanek. Przełyk oddzielono na tępo z ominięciem i oszczędzeniem nerwów błędnych. Na bocznej (lewej) ścianie przełyku wykonano linijne nacięcie długości ok. 12 mm, rozpoczynając 3 mm powyżej wpustu żołądka i w kierunku dogłowym. Cięcie wykonano na możliwie najdłuższym odcinku przełyku w celu uzyskania jak największego obszaru narażonego na działanie treści żołądkowo-jelitowej. Zwieracz dolny przełyku nacięto liniowo na długości ok. 1–2 mm, bez przerywania ciągłości śluzówki (mięsień pozostawiony bez szycia), ułatwiło to zarzucanie treści pokarmowej w dolnym odcinku przełyku. W ścianie dwunastnicy, w odległości ok. 5 cm od odźwiernika, na biegunie przeciwnym do krezki wykonano owalne nacięcie długości 12 mm. Dwunastnicę uformowano w pętlę i wykonano zespolenie bok przełyku z bokiem dwunastnicy w miejscach wcześniej wykonanych nacięć. Ścianę przełyku z jelitem zszyto jedną warstwą pojedynczych szwów węzłkowych w liczbie ok. 14–16 na każde zespolenie (ryc. 2).

Drugi typ – zabieg B – polegał na wykonaniu zespolenia koniec przełyku do boku dwunastnicy [22, 23]. Po wypreparowaniu na tępo przełyk poprzecznie przecięto w odległości ok. 3–4 mm od wpustu żołądka, tak aby w możliwie jak największym zakresie usunąć zwieracz dolny przełyku. Kikut żołądka z dolnym zwieraczem

podwiązano (Vicryl 5-0) w celu zamknięcia jego światła i przemieszczono w okolicę podwątrobową. W odległości ok. 5 cm od odźwiernika żołądka wykonano w ścianie dwunastnicy okrągły otwór o średnicy przełyku, tj. 2–3 mm. Koniec przełyku zszyto z dwunastnicą jedną warstwą pojedynczych szwów węzłkowych w liczbie 6–8. Zabiegi A i B charakteryzuje występowanie refluksu treści mieszanej, żołądkowo-jelitowej. Modele te najlepiej odwzorowują warunki patologiczne występujące u ludzi chorujących na GERD (ryc. 3).

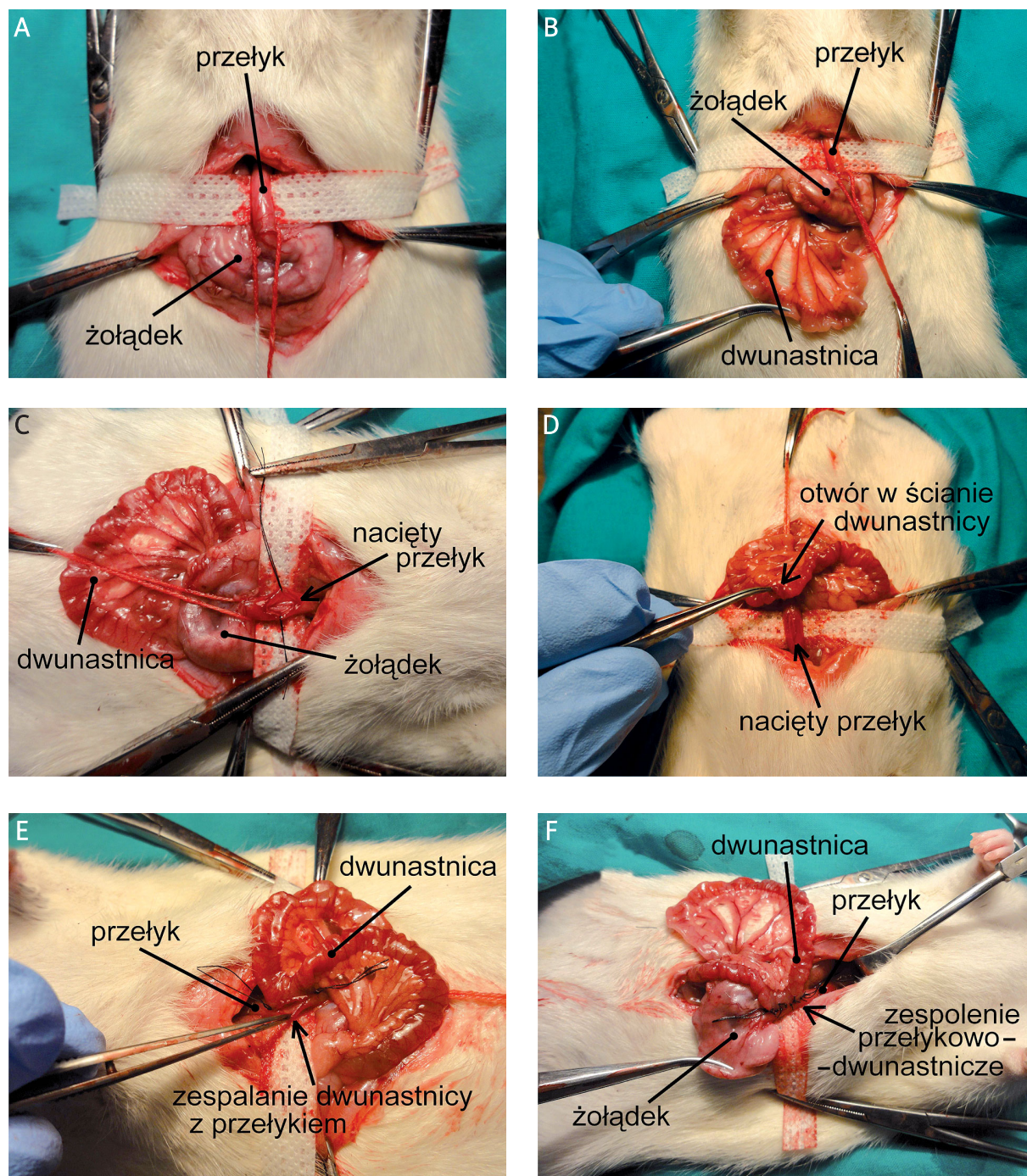
Trzeci typ – zabieg C – polegał na wykonaniu zespolenia koniec przełyku do boku dwunastnicy z całkowitą resekcją żołądka. Przecięto więzadło wątrobowo-żołądkowe. Następnie na tępo wypreparowano żołądek i dokonano podwiązania wszystkich krwawiących naczyń w celu ograniczenia wynaczynienia krwi podczas resekcji żołądka. Żołądek odcięto ponad wpustem ok. 3–4 mm powyżej LES. Bliższy odcinek dwunastnicy podwiązano i uwolniono od żołądka. W odległości ok. 5 cm od wytworzonego kikuta dwunastnicy wykonano na przeciwległym do krezki brzegu okrągły otwór o średnicy 2–3 mm w zależności od średnicy przełyku. Zespolenie przełyku z dwunastnicą przeprowadzono za pomocą pojedynczych jednowarstwowych szwów węzłkowych w liczbie 6–8. W ten sposób w tej grupie zwierząt spowodowano refluks wyłącznie treści dwunastniczej (alkaliczny), któremu przypisuje się największy potencjał wywoływania zmian o typie metaplazji jelitowej (ryc. 4.) [4, 7].

W zależności od warunków anatomicznych zespolenia przełykowo-jelitowe wykonywano przy użyciu szwów Surgilon 7-0 lub 8-0 na atraumatyzującej igle,



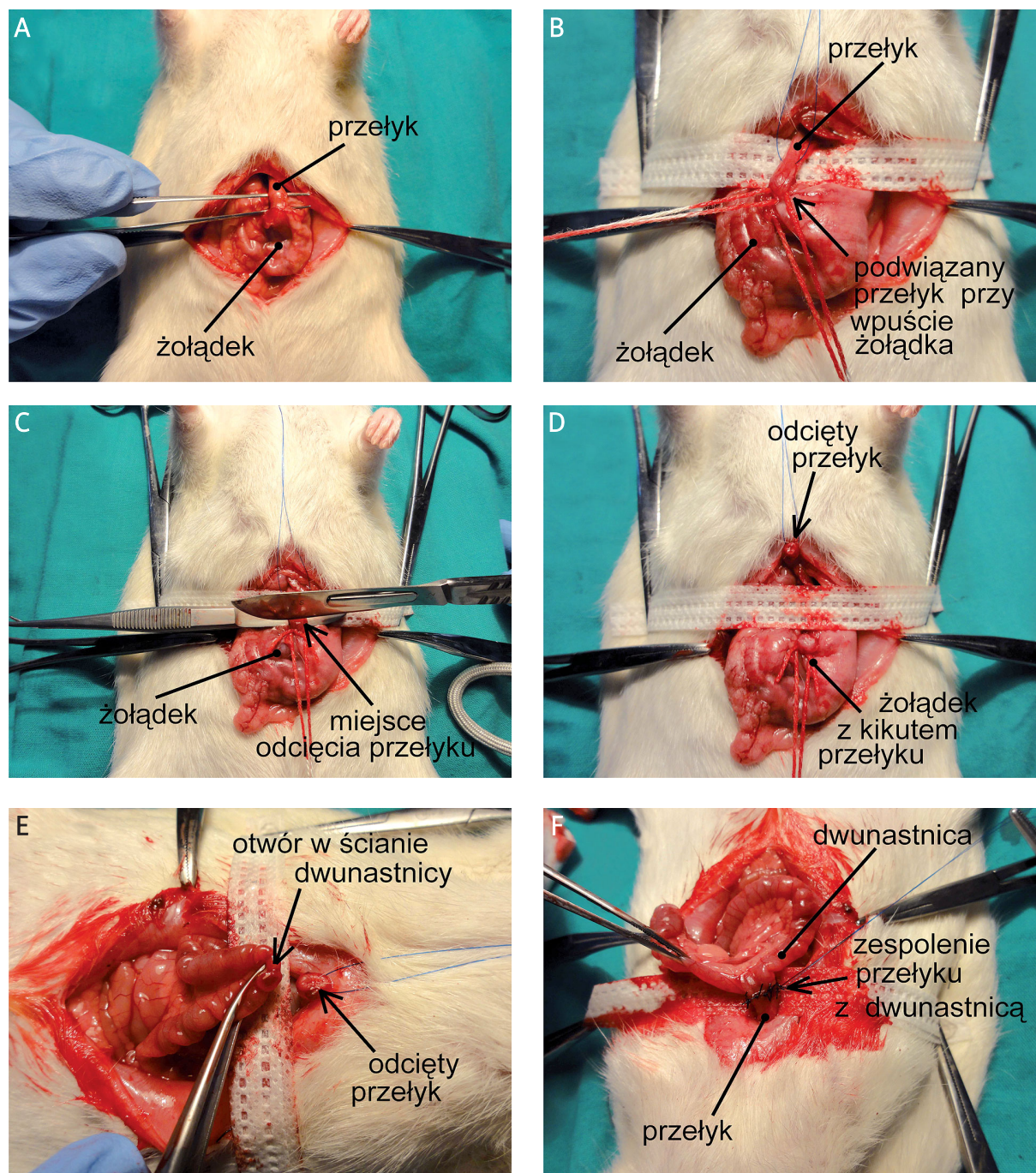
Ryc. 1. Schemat przedstawiający modele zabiegów wykorzystywanych do wywołania przewlekłego refluksu przełykowego

Fig. 1. Schematic presentation of different surgical interventions used in this study to develop a chronic gastroesophageal reflux oesophagitis



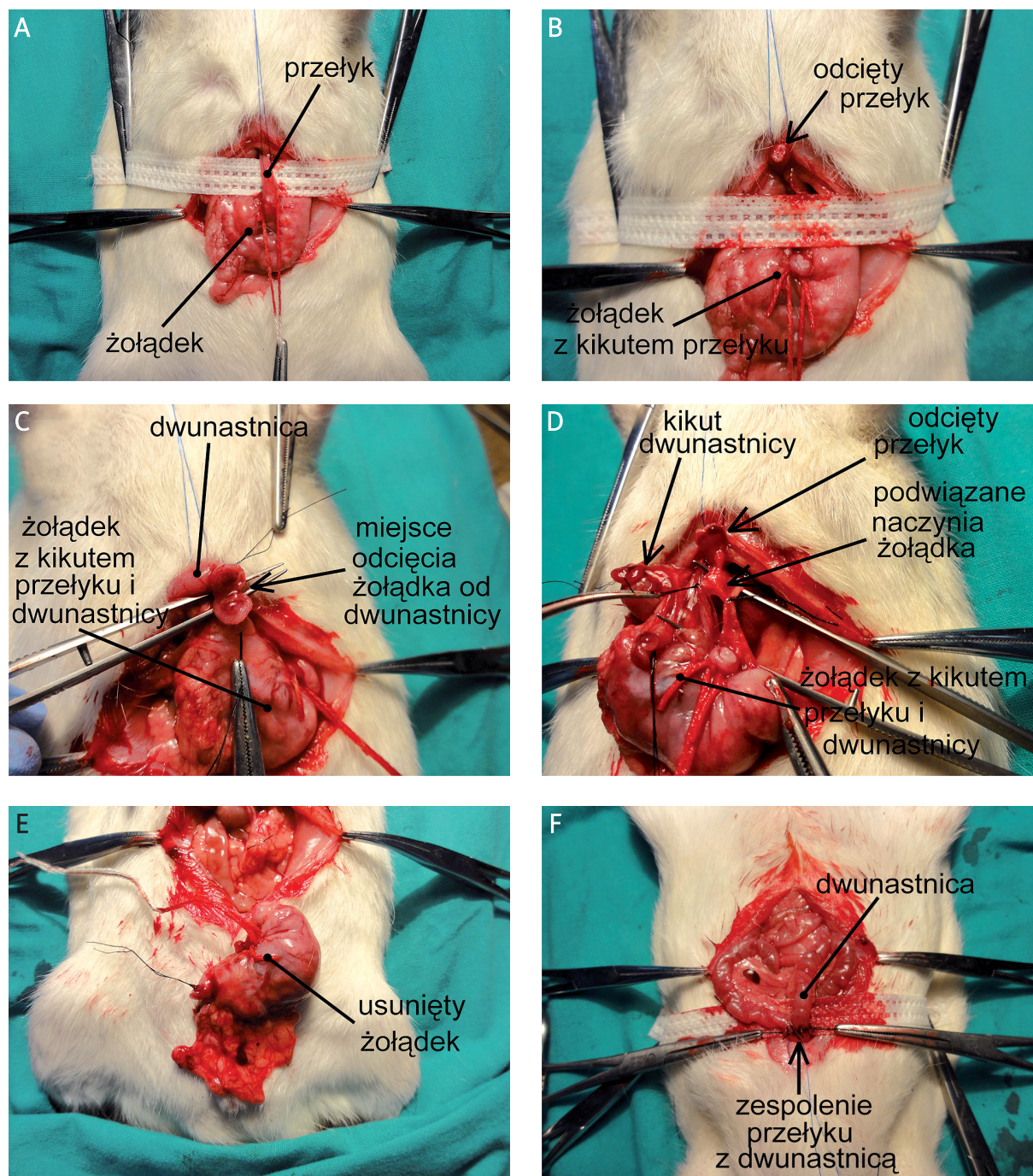
Ryc. 2. Główne etapy wykonania zespolecia przetykowo-dwunastniczego bok przetyku do boku dwunastnicy. (A) Mobilizacja i uwolnienie przetyku od otaczających tkanek. (B) Mobilizacja i wyznaczenie miejsca zespolecia na dwunastnicy. (C) Wykonanie nacięcia przetyku. (D) Wykonanie owalnego nacięcia w ścianie dwunastnicy. (E) Początek wykonania zespolecia. (F) Zakończenie wykonywania zespolecia

Fig. 2. Main stages of side-to-side oesophago-duodenal anastomosis. (A) Mobilization and release of oesophagus from surrounding visceral tissue. (B) Mobilization and fixing the place of anastomosis on duodenal wall. (C) Incision in oesophageal wall to form anastomosis. (D) Incision in duodenal wall to form anastomosis. (E) Primary anastomosis at the beginning of surgical operation. (F) Final appearance of anastomosis at the end of surgical operation



Ryc. 3. Zespolenie koniec przełyku do boku dwunastnicy z repozycją żołądka. (A) Mobilizacja i uwolnienie przełyku od otaczających tkanek. (B) Podwiązanie połączenia przełykowo-żołądkowego. (C, D) Poprzeczne przecięcie przełyku i repozycja kikutka żołądka wraz z LES pod wątrobę. (E) Mobilizacja dwunastnicy z wykonaniem okrągłego otworu na jej przeciwległej ścianie do krezki w celu wykonania zespolenia koniec do boku. (F) Zespolenie przełyku z dwunastnicą

Fig. 3. Main stages of end-to-side oesophago-duodenal anastomosis with reposition of the stomach. (A) Mobilization and release of oesophagus from the surrounding visceral tissues. (B) Ligation of the oesophago-gastric junction. (C, D) Cross cut of oesophagus with reposition of the stomach stump together with LES under the liver. (E) Mobilization of duodenum and making round hole in free wall of duodenum to carry out end-to-side anastomosis. (F) Oesophago-duodeno anastomosis



Ryc. 4. Całkowita gastrektomia z zespoleniem koniec przełyku do boku dwunastnicy. (A) Mobilizacja i uwolnienie przełyku od otaczających tkanek. (B) Uwolnienie żołądka wraz z LES od przełyku. (C) Uwolnienie żołądka od dwunastnicy z podkłuciem kikutu dwunastnicy i repozycją pod wątrobę. (D) Podkłucie dużych naczyń zaopatrujących żołądek. (E) Resekcja żołądka. (F) Wykonanie zespolenia koniec przełyku do boku dwunastnicy

Fig. 4. Total gastrectomy and end-to-side oesophago-duodeno anastomosis. (A) Mobilization and release of oesophagus from near tissues. (B) Release of stomach with LES from oesophagus. (C) Release of stomach from duodenum using sutures to close duodenal stump and its repositioning from the liver. (D) Suturing to close blood vessels surrounding the stomach. (E) Gastrectomy (removal of the stomach). (F) Formation of end-to-side oesophago-duodenal anastomosis

wielofilamentowych, niewchłanialnych. Krwawiące naczynia podkuwano Vicrylem 6-0. W ramach profilaktyki okołoperacyjnej przed zamknięciem powłok brzusznych aplikowano dootrzewnowo cefuroksym (cefalosporyna II generacji o szerokim spektrum działania bakteriobójczego) w dawce 165 mg/kg m.c. Powłoki brzuszne zamknięto dwoma warstwami szwów ciągłych (Dexon 4-0), oddzielnie zszywając odpowiednio otrzewną z mięśniami i skórę. Podskórnie zwierzętom podawano 20 ml soli fizjologicznej w okolice karku w celu uzupełnienia płynów utraconych w trakcie operacji. Po zabiegu zwierzęta uzyskiwały dostęp do wody po 24 godz., a żywienie wprowadzano po 48 godz. od zabiegu. Po okresie okołoperacyjnym dla każdej z grup zwierząt stworzono identyczne warunki bytowania oraz nieograniczony dostęp do wody i pożywienia.

Całkowita przeżywalność zwierząt po zabiegach w grupie A, B i C wyniosła odpowiednio 100%, 97% i 94%. Najczęstsza przyczyna zgonu nie została zdiagnozowana, w dwóch przypadkach zgon nastąpił w wyniku krwotoku pooperacyjnego, a w jednym przypadku z powodu zapalenia otrzewnej. W trakcie prowadzenia badań wyraźnie zauważalny był wyniszczający wpływ GERD na stan ogólny zwierząt, objawiający się przede wszystkim znaczną utratą masy ciała, apetytu, spadkiem aktywności życiowej i ogólnoustrojowym wyniszczeniem. Poza wyżej wymienionymi objawami ogólnymi nie stwierdzono wpływu zabiegu na śmiertelność i 3-miesięczny cykl eksperymentu przeżyły wszystkie pozostałe zwierzęta.

Schemat badań

Zwierzęta karmiono granulatem stanowiącym pełnowartościowe pożywienie bogate w niezbędne składniki odżywcze, witaminy, makro- i mikroelementy. W trakcie badania ilość granulatu nie była ograniczana. Szczury przechowywano w warunkach standardowych. Po upływie 1, 2 i 3 mies. od zabiegu 1/3 przypadkowo wybranych osobników z każdej z grup usypiano przez podanie dootrzewnowo letalnej dawki pentobarbitalu. Zmieniony chorobowo przełyk usuwano proksymalnie od wysokości gardła i dystalnie z fragmentem dwunastnicy w miejscu wykonanego zespolenia. Przełyk po wypreparowaniu przepłukano solą fizjologiczną i przecięto podłużnie na całej długości, łącznie z otwarciem miejsca zespolenia. Zmiany histologiczne powstałe w błonie śluzowej przełyku poddano szczegółowej analizie makro- i mikroskopowej.

Ocena makroskopowa

W zmienionym chorobowo przełyku badano takie cechy, jak: poszerzenie światła, zakres uszkodzeń śluzówki wzdłuż osi długiej, głębokość uszkodzeń, stopień

rozpulchnienia śluzówki, obecność owrzodzeń, guzów nowotworowych i innych nieprawidłowości. Powierzchnię uszkodzeń błony śluzowej przełyku sklasyfikowano wg 5-stopniowej skali rozległości uszkodzeń – indeks LSI (*lesion score index*), gdzie: 1 = 0%, 2 = 25%, 3 = 50%, 4 = 75% i 5 = 100% powierzchni śluzówki przełyku objętej uszkodzeniem. Każdorazowo wykonano dokumentację fotograficzną powstałych uszkodzeń w poszczególnych okresach czasowych zmian rozwijających się podczas przewlekłego zapalenia przełyku.

Ocena mikroskopowa

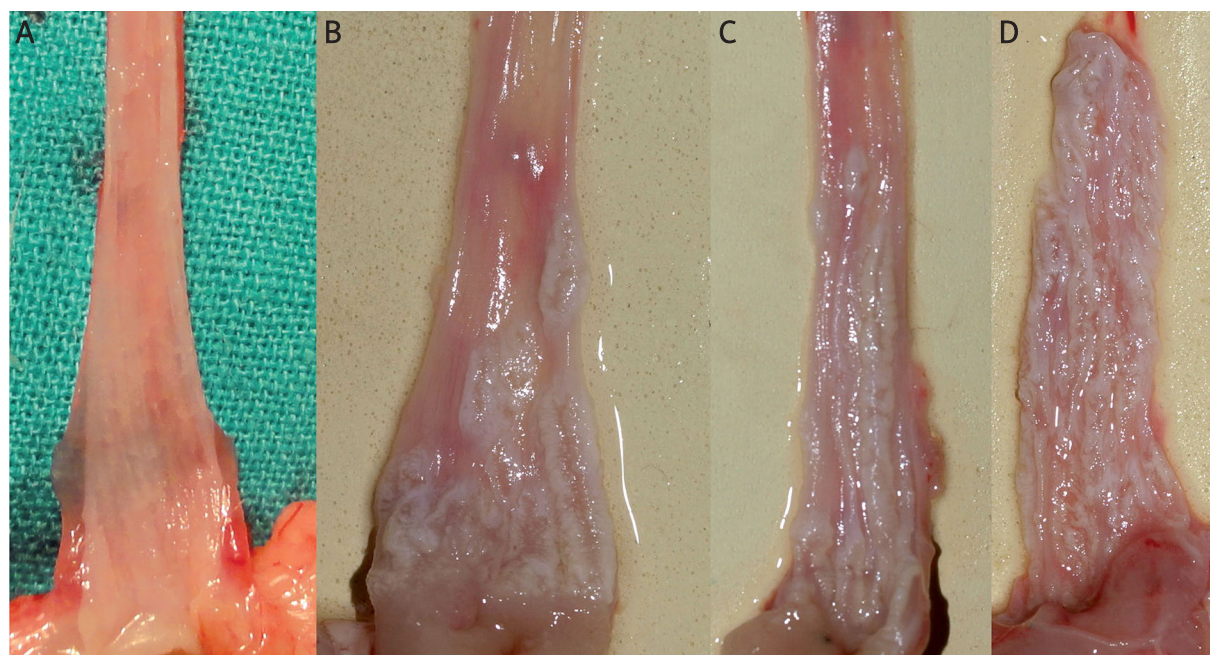
Biopsje błony śluzowej przełyku pobierano z dystalnej części przełyku w obszarze obejmującym anastomozę. Preparaty utrwalano w roztworze formaliny o stężeniu 10% i poddawano ocenie w Katedrze Patomorfologii UJCM (dr med. Katarzyna Urbańczyk). Z każdego fragmentu pobrano 3–6 wycinków, które utrwalono wg standardowych procedur z użyciem odpowiednich roztworów i wykonano skrawki o grubości 3 μ m. Preparaty barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną oraz dodatkowo metodą *alcian blue* + PAS. W badaniu histopatologicznym określono poziom zaawansowania zmian tkankowych, stopień odróżnicowania komórek, metaplastzę, dysplazję i obecność komórek nowotworowych. Powstałe zmiany opisano za pomocą 5-stopniowej skali zaawansowania zmian histologicznych HSI (*histological score index*), gdzie: 0 oznacza występowanie zapalenia, 2 – metaplastzę jelitową, 3 – dysplazję, a 4 – gruczolakoraka.

Wyniki

W przeprowadzonym eksperymencie wykazano, że u zoperowanych zwierząt w grupach A, B i C po upływie 1, 2 i 3 mies. od zabiegu doszło do rozwoju zmian morfologicznych błony śluzowej przełyku, porównywalnych z wyglądem makroskopowym zdrowej błony śluzowej zwierząt niepoddanych zabiegom zespolenia. Zmiany makroskopowe przełyku powstały u tych zwierząt bez stosowania egzogennych kancerogenów, wyłącznie w wyniku przeprowadzonych zabiegów chirurgicznych.

Wyniki oceny makroskopowej

Zaawansowanie powstałych zmian było najwyraźniej widoczne w grupie C, zasięg zmian makroskopowych był jednak największy w modelu A, gdyż uszkodzenia obserwowano na prawie całej długości przełyku. W grupie B i C zmiany zlokalizowane były głównie w 1/3 dolnej przełyku. Zmiany makroskopowe polegały na znacznym rozpulchnieniu błony śluzowej przełyku, poszerzeniu światła przełyku, ponadto u większości zwierząt występowały owrzodzenia i egzofityczne guzy mogące sugerować proces nowotworowy. W grupie B



Ryc. 5. Porównanie zmian makroskopowych śluzówki przełyku. (A) Przełyk prawidłowy. (B) Uszkodzenia powstałe po miesiącu. (C) Uszkodzenia powstałe po 2 mies. (D) Uszkodzenia powstałe po 3 mies.

Fig. 5. Comparison of macroscopic lesions of the oesophageal mucosa. (A) Intact oesophagus. (B) Oesophageal lesions after one month. (C) Oesophageal lesions after 2 months. (D) Oesophageal lesions after 3 months

zmiany powstałe w wyniku działania treści mieszanej żołądkowo-dwunastniczej były najmniej zaawansowane. We wszystkich przypadkach stwierdzono znaczne ścieńczenie błony śluzowej przełyku oraz zwiększenie grubości ściany przełyku, zwłaszcza w obrębie zespoleń. Dodatkowo w obrębie zmian makroskopowych zaobserwowano białawe, guzowate zmiany o egzofitycznym, podłużnym charakterze wzrostu wyścielające błonę śluzową. Nieprawidłowości strukturalne były również zauważalne w obrębie wpustu żołądka i w tkankach przyległych do przełyku (ryc. 5.).

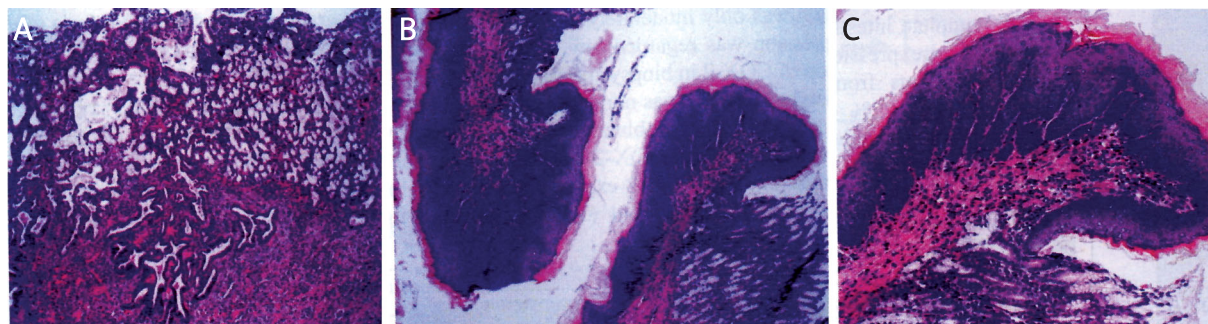
Wyniki oceny mikroskopowej

W badaniu mikroskopowym we wszystkich przypadkach stwierdzono przewlekłe zapalenie błony śluzowej przełyku, poczynając od małego do dużego stopnia. Oceny histologicznie naciek zapalny składał się głównie z limfocytów, plazmacytów i znacznej liczby eozynofili, w nielicznych przypadkach stwierdzono neutrofile. Opisywane nieswoiste zapalenie i ziarnina obejmowały głównie blaszkę właściwą śluzówki przełyku. Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący pokrywający śluzówkę we wszystkich preparatach wykazywał rozrost brodawkowaty i akantocytyny. Również we wszystkich modelach stwierdzono rozrost warstwy przypodstawnej (*hyperplasia basalis*). Często obserwowano owrzodzenia, które obejmowały całą grubość blaszki właściwej,

a w ich dnie stwierdzano obecność ziarniny. Brzegi owrzodzeń wyścielał nabłonek wielowarstwowy płaski wykazujący cechy regeneracji i rozrostu akantocytyny. W licznych przypadkach potwierdzono rozległą metaplastykę Barretta z cechami dysplazji na odcinku 2–6 mm. Najwyraźniej zmiany o typie BE występowały w modelu z wykonaną gastrektomią (treść alkaliczna) i w drugiej kolejności w modelu z anastomozą bok do boku (model A). Ogniskowo potwierdzono obecność raka płaskonabłonkowego częściowo rogowaciejącego o średnicy do 3 mm. W wielu przypadkach opisano wielogniskowy naciek raka gruczołowego wielkości ok. 2 × 4 mm. Liczba opisanych przypadków BE i EAC po 3 mies. eksperymentu przekraczała 42%. Fain i wsp. w podobnym badaniu przez 4 mies. od wykonania zabiegu stwierdzili 48% potwierdzonych histopatologicznie przypadków EAC [9], natomiast Miwa i wsp. po 50 tyg. od wykonania zabiegu potwierdzili EAC aż u 72% zbadanych zwierząt [26]. Zmiany metaplastyczne w znacznej większości były zlokalizowane tuż przy granicy wykonanych zespoleń, a guzy nowotworowe na ich obszarze (ryc. 6.).

Omówienie

Z badań przeprowadzonych w Katedrze Fizjologii CMUJ wynika, że stworzone modele doświadczalnego przewlekłego zapalenia przełyku naśladują kliniczny rozwój patologii przewlekłego zapalenia przełyku u czło-



Ryc. 6. Histopatologia błony śluzowej przełyku. **(A)** Gruczolakorak naciekający ścianę przełyku. **(B, C)** Meta-plazja Barretta z niekompletnym rozwojem kosmków i krypt
Fig. 6. Oesophageal mucosa histology. **(A)** Adenocarcinoma infiltrating wall of oesophagus. **(B, C)** Barrett's metaplasia with incomplete development of villi and crypts

wieka, szczególnie w przypadku refluksu jelitowo-żołądkowo-przełykowego. Dotychczas w większości prac opisywano przede wszystkim modele ostrego zapalenia przełyku, względnie kilkudniowej czy kilkutygodniowej obserwacji po indukcji refluksu żołądkowo-przełykowego. W praktyce klinicznej przebieg GERD jest jednak przewlekły, najczęściej wieloletni i dochodzi wówczas do poważnych powikłań, takich jak metaplasja Barretta czy rozwój raka. W opisywanych modelach uzyskano zmiany histopatologiczne ocenione w Katedrze Patomorfologii CMUJ jako: 1) metaplasja Barretta, 2) ogniska dysplastyczne małego, średniego i dużego stopnia oraz 3) ogniska gruczolakoraka przełyku. Potwierdza to poprawność przyjętych metod wywoływania tych zmian oraz stwarza możliwości terapeutyczne w postaci testowania leków zapobiegających tego typu uszkodzeniom.

Stopniowe i harmonijne narastanie zmian w zastosowanych modelach umożliwia obserwację kolejnych etapów kancerogenezy w jej naturalnym przebiegu, prowadzącym do konwersji BE w EAC bez użycia substancji chemicznych, które mogłyby przyspieszyć ten proces. Ponadto w większości przeprowadzonych dotychczas badań, w których sprawdzano wpływ kancerogenów na rozwój nowotworu, uzyskane zmiany potwierdzone w badaniu histopatologicznym miały charakter raków płaskonabłonkowych [22, 27–29]. W obecnym modelu w znacznej większości doszło do rozwoju gruczolakoraka, który jest najczęstszym histologicznym typem nowotworu transformującym z BE.

W przypadku modelu A, czyli zespolenia bok przełyku do boku dwunastnicy, powstające zmiany narastają stopniowo i systematycznie. Model ten z punktu widzenia możliwości prowadzenia eksperymentów w długim czasie wydaje się najbardziej przydatny. Czas poświęcony na wykonanie zabiegu jest najkrótszy ze wszystkich prezentowanych przypadków i wynosi ok. 30 min. Przeżywalność w tej grupie zwierząt jest największa, a dłu-

go utrzymujący się dobry stan ogólny w przebiegu choroby umożliwia prowadzenie długoterminowych badań. Autorzy sądzą, że pozwala to uzyskać obiektywne, powtarzalne i wiarygodne wyniki dotyczące skuteczności testowanych leków i innych nowatorskich metod leczenia.

W chirurgicznym modelu C – zespolenie koniec przełyku do boku dwunastnicy z repozycją żołądka – ze względu na alkaliczny refluks treści jelitowej, któremu przypisuje się największe znaczenie w patogenezie BE, uzyskano obrazy histologiczne o najwyższym stopniu zaawansowania zmian metaplastycznych i dysplastycznych. Po wykonaniu tego typu zabiegu stwierdzono największą liczbę nowotworów – gruczolakoraków – potwierdzonych w badaniu histopatologicznym. Eksperyment z zastosowaniem tego modelu ze względu na agresywny przebieg i szybkie wyniszczenie organizmu może być jednak stosowany w cyklach o krótszym czasie trwania. Wymaga on również większego doświadczenia chirurgicznego i szczególnej staranności podczas resekcji żołądka w celu uniknięcia powikłań, jakie występują najczęściej w tym typie zabiegu. Czas wykonania jest najdłuższy, często ponad godzinę w celu wykonania całkowitego chirurgicznego zaopatrzenia zwierząt.

W modelu B uzyskano refluks treści mieszanej. Zmiany patologiczne zachodzą najwolniej ze wszystkich zaproponowanych procedur operacyjnych. Zakres zmian powstałych w przełyku również jest najmniejszy. Zabieg technicznie cechuje się średnią trudnością wykonania, a czas operacji wynosi ok. 45 min.

Wykonane modele doświadczalnego przewlekłego refluksu jelitowo-żołądkowo-przełykowego cechuje duża powtarzalność obserwacji, a uzyskane w ten sposób wyniki morfologiczne i czynnościowe naśladują kliniczny charakter zapalenia przełyku. Opracowane modele umożliwiają systematyczne prowadzenie badań

w długim czasie, co ułatwia i umożliwia poznanie patogenyzy zmian oraz mechanizmów kancerogenezy w przebiegu GERD.

Przeprowadzone badania świadczą o tym, że nie tylko kwaśna treść żołądkowa, ale przede wszystkim alkaliczna treść dwunastnicza zawierająca sole żółciowe i aktywne enzymy trzustkowe przyczynia się do rozwoju złośliwej transformacji BE w EAC. Chirurgiczne modele refluku umożliwiając śledzenie kaskady zmian zachodzących w kolejnych etapach choroby w warunkach doświadczalnych i przede wszystkim dają możliwość włączenia długoterminowej farmakoterapii na wybranych etapach nowotworzenia w celu opóźnienia lub całkowitej eliminacji progresji stanu zapalnego i metaplazji Barretta w kierunku zmian o typie nowotworowym.

Piśmiennictwo

- Nimish V, Sander V, Kahrilas P, et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-base consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-20.
- Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Esophageal inflammation in gastroesophageal reflux disease (GERD): role of chemokines. *Inflam Regen* 2006; 26: 428-36.
- Abrams JA. Are we making progress in preventing Barrett's-related esophageal cancer? *Therap Adv Gastroenterol* 2009; 2: 73-7.
- Naito Y, Uchiyama K, Kuroda M, et al. Role of pancreatic trypsin in chronic esophagitis induced by gastroduodenal reflux in rats. *J Gastroenterol* 2006; 41: 198-208.
- Piazuelo E, Cebrian C, Escartin A, et al. Superoxide dismutase prevents development of adenocarcinoma in a rat model of Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7436-43.
- Shaheen N, Ranshoff DF. Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002; 287: 1972-81.
- Nishijima K, Miwa K, Miyashita T. Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodenoesophageal reflux in rats. *Ann Surg* 2004; 240: 57-67.
- Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, et al. Increased expression of epidermal growth factor receptors in basal cell hyperplasia of oesophagus after acid reflux oesophagitis in rats. *Alim Pharm Ther* 2002; 16: 52-8.
- Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, et al. Duodenoesophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 260-8.
- Su Y, Chen X, Klein M, et al. Phenotype of columnar – lined esophagus in rats with esophagogastrroduodenal anastomosis: similarity to human Barrett's esophagus. *Lab Invest* 2004; 84: 753-65.
- Malfertheiner P, Hallebrack B. Clinical manifestations and complications of gastroesophageal reflux disease (GERD). Blackwell Publishing Ltd 2005; 59: 346-55.
- Blot WJM, Laughlin JK. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 2-8.
- Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 349: 2241-52.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P. Cancer incidence, mortality and prevalence world wide. *J Clin Onco* 2006; 14: 2137-50.
- Jemal A, Murray T, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
- Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, et al. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-31.
- Majka J, Szlachcic A, Pabiańczyk R, et al. Funkcjonalne znaczenie wzajemnej interakcji aktywności cyklooksygenazy-2, nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) i jego receptora w patogenyzie przewlekłego zapalenia przełyku w świetle badań klinicznych i doświadczalnych. *Gastroenterol Pol* 2009; 16: 45-9.
- Buttar NS, Wang KK. Mechanisms of disease: Carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 106-12.
- Naghama K, Yamoto M, Nishio H, et al. Essential role of pepsin in pathogenesis of acid reflux esophagitis in rats. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 303-9.
- Tsuji H, Fuse Y, Fujino KH. Healing process of experimental esophageal ulcers induced by acetic acid in rats. *Scand J Gastroenterol* 1989; 62: 6-10.
- Omura N, Kashiwagi H, Chen G, et al. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1999; 10: 948-53.
- Pera M, Cardesa A, Bombi JA, et al. Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague – Dawley Rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. *Cancer Res* 1989; 49: 6803-8.
- Levrat M, Lambert R, Kirshbaum G. Esophagitis produced by reflux of duodenal contents in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 17: 564-73.
- Bae JD, Jung KH, Ahn WS, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in rat Barrett's esophagus induced by duodenal contents reflux. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 56-60.
- Li Y, Wo JM, Su RR, et al. Esophageal injury with external esophageal perfusion. *J Surg Res* 2005; 129: 107-13.
- Miwa K, Sahara H, Segawa M, et al. Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer* 1996; 67: 269-74.
- Attwood SE, Smyrk TC, DeMeester TR, et al. Duodenoesophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery* 1992; 111: 503-10.
- Clark GW, Smyrk TC, Mirvish SS, et al. Effect of gastroduodenal juice and dietary fat on the development of Barrett's esophagus and esophageal neoplasia: an experimental rat model. *Ann Surg Oncol* 1994; 1: 252-61.
- Ireland AP, Peters JH, Smyrk TC, et al. Gastric juice protects against the development of esophageal adenocarcinoma in the rat. *Ann Surg* 1996; 67: 269-74.