

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Marek Kollár

IMUNOHISTOCHEMICKÉ A MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ MARKERY
V PREDIKCI PROGRESE NEOPLAZIÍ JÍCNU V KORELACI S PATOFYZIOLOGIÍ

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC MARKERS
IN PREDICTING THE PROGRESSION OF ESOPHAGEAL NEOPLASIA
IN CORRELATION WITH PATHOPHYSIOLOGY

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jan Martínek, Ph.D. AGAF.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu. theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 15.10.2022

Marek Kollár

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval zejména svému školiteli, prof. MUDr. Janu Martínkovi, Ph.D., A.G.A.F., za odborné a profesní vedení, za jeho trpělivost a velkou otevřenost při sdílení nových poznatků a umožnění vzdělávání se, jakož i za získávání nejnovějších poznatků během mnohých zahraničních cest. Velký dík patří také MUDr. Janě Maluškové, která hodnotila většinu resekátů.

Dále bych rád poděkoval své manželce, nejbližší rodině a kolegům z Pracoviště klinické a transplantační patologie v IKEM, MUDr. Lud'ku Voskovi a MUDr. Martinu Kmentovi, mým mentorům v patologii a přátelům, kteří mě podporovali v nejvíce potřebných chvílích během studia.

Bez nikoho z výše jmenovaných by tato práce nejspíše nevznikla.

V Praze 15.10.2022

Marek Kollár

Identifikační záznam

KOLLÁR, Marek. *Imunohistochemické a molekulárně-genetické markery v predikci progresu neoplázií jícnu v korelaci s patofyziologií. [Immunohistochemical and molecular-genetic markers in prediction of progression of esophageal neoplasia in correlation with pathophysiology.]* Praha, 2021. 101 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Pracoviště klinické a transplantační patologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha. Vedoucí práce Martínek, Jan.

Úvodní slovo

Rád bych před samotnou odbornou částí mé disertační práce řekl několik slov.

Upřímně řečeno, prakticky vše kolem zahájení mé disertační práce bylo zvláštní a netypické.

Po ukončení studií na své Alma mater, 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, jsem chtěl pokračovat v dalším vzdělávání nejen v rámci přípravy k atestaci z patologie, ale chtěl jsem absolvovat i postgraduální studium, jelikož se domnívám, že vzájemná souhra klinických či odborných dovedností se vhodně doplňuje s vědeckou přípravou a schopností vytvořit, provést a následně i publikovat vědecký projekt. Bohužel, na samém začátku se příliš nepovedlo ani jedno, ani druhé – k patologii samotné jsem se dostal až po dvou letech tápání v laboratořích, a to díky kolegyni Evě Sticové, které si nejen proto velice vážím a děkuji jí. Ale zpět k postgraduálnímu studiu.

Původně hlavním tématem mé disertační práce měla být problematika glomerulonefritid, neboť jsem byl svou přednostkou směřován zejména k nefropatologii.

Bohužel (nebo bohudík?) jsem pár měsíců po ukončení lékařské fakulty nedokázal vymyslet smysluplný projekt, se kterým bych se mohl účastnit přijímacích zkoušek. Později mne oslovil vedoucí tzv. jícnové skupiny v IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny), dnes profesor (tehdy docent) Martínek s tím, zda bych s nimi nechtěl spolupracovat, a nabídl mi, že by se mohl stát i mým školitelem, pokud by tématem mé disertace byla problematika časných neoplázií jícnu. Po chvíli přemýšlení a diskuzí jsem souhlasil, i když mnohým připadalo zvláštní, že mým školitelem je gastroenterolog, nikoli patolog.

IKEM je pro studium problematiky neoplázií jícnu i dalších onemocnění jícnu (včetně výzkumu, diagnostiky a léčby širokého spektra motilitních poruch jícnu a žaludku) vhodným místem, jelikož zde bylo příchodem pana profesora založeno významné centrum diagnostiky a léčby onemocnění jícnu a žaludku, přičemž léčba časných karcinomů je jedním z pilířů tohoto programu. Další výhodou byla i skutečnost, že jsem se mohl zapojit do několika grantových projektů této skupiny a úzce spolupracovat na jejich řešení jako jakýsi dvorní patolog. Vzhledem k širokému záběru této skupiny zabývající se celým spektrem onemocnění jícnu a žaludku jsem měl možnost zapojit se prakticky do čehokoli, experimenty nevyjímaje.

Problematika onemocnění jícnu by se asi dala směrem k laické (a možná i odborné) veřejnosti lehce s nadsázkou shrnout slovy profesora Martínka z úvodu k jeho habilitační práci: „Říci, že se lékař zabývá problematikou gastroezofageálního refluxu, není na první pohled tak ‚sexy‘ jako např. léčba těžké pankreatitidy.” Dovolím si však poznamenat, že z mého pohledu nejen jako postgraduálního studenta, ale i patologa, jsem to viděl jinak. Díky výše zmíněnému širokému záběru „jícnové skupiny”, novým diagnostickým metodám i rozvoji tzv. endoskopické chirurgie, kde jsem mohl (a z důvodu diagnostiky pomocí konfokální laserové endomikroskopie v reálném čase často i musel) být přítomný při různých inovativních a z mého pohledu až heroických

endoskopických výkonech. Myslím, že celá práce této skupiny je záslužná, cílevědomá, vede k výchově mnohých kvalitních lékařů a endoskopistů, začleňuje mezi sebe i studenty medicíny a má nemalé vědecké úspěchy. Jsem rád, že jsem se části projektů této skupiny mohl zúčastnit a čtyři z nich jsou součástí mé disertace. Je nepochybné, že tato oblast je velice zajímavou i pro patologa.

Celá disertace je souhrnem čtyř projektů, nejpodstatnější je projekt první, kde jsme analyzovali přítomnost metastáz, mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk v lymfatických uzlinách u pacientů po endoskopické léčbě, kteří byli pro pokročilost neoplázie indikováni k léčbě chirurgické. Překvapivým zjištěním naší analýzy je, že mnoho pacientů bylo operováno zbytečně, neboť endoskopická léčba pro ně nejspíše představovala kurativní zákrok. Věnovali jsme se i nalezení prediktorů možné progresy či generalizace. Dalším zásadním tématem mé práce je využití nové diagnostické metody, pro patologa velmi zajímavé konfokální laserové endomikroskopie, která má potenciál v budoucnu doplnit standardní histopatologické vyšetření.

Děkuji tímto ještě jednou za vše prof. Martínkovi, za jeho trpělivost, znalosti a čas.

Obsah

SOUHRN	10
ABSTRACT	12
SEZNAM ZKRATEK	14
1 ÚVOD	16
1.1 <i>Anatomie a histologie jícnu, fyziologie sliznice jícnu</i>	16
1.2 <i>Adenokarcinom</i>	17
1.2.1 Epidemiologie	17
1.2.2 Rizikové faktory, prekancerózy, Barrettův jícen a adenokarcinom	18
1.2.3 Původ a vznik Barrettova jícnu a adenokarcinomu.....	19
1.2.4 Patofyziologie a patogeneze Barrettova jícnu	20
1.2.5 Molekulární mechanismy vzniku Barrettova jícnu / intestinální metaplázie	20
1.2.6 Progrese Barrettova jícnu do adenokarcinomu.....	21
1.2.7 Molekulární mechanismy vzniku adenokarcinomu.....	22
1.2.8 Protein p53	22
1.2.9 Diagnostika Barrettova jícnu	23
1.2.10 Sledování (surveillance) pacientů s Barrettovým jícnem.....	24
1.2.11 Doplnující zobrazovací modalitty	25
1.2.12 Antirefluxní léčba pacientů s Barrettovým jícnem.....	29
1.3 <i>Spinocelulární karcinom</i>	30
1.3.1 Epidemiologie	31
1.3.2 Etiologie	32
1.3.3 Molekulární mechanismy vzniku spinocelulárního karcinomu	32
1.3.4 Diagnostika.....	33
1.4 <i>Časný karcinom jícnu</i>	33
1.4.1 Kritéria indikace a kurability endoskopické léčby	34
1.4.2 Riziko generalizace na základě hloubky invaze nádoru.....	35
1.4.3 Endoskopické modalitty léčby Barrettova jícnu a časných karcinomů jícnu.....	36
1.5 <i>Rekurence Barrettova jícnu po léčbě a problematika sledování</i>	39
1.6 <i>Problematika tzv. “buried glands”</i>	40
1.7 <i>Histopatologie – zpracování a hodnocení vzorků z ER/ESD, staging</i>	40
2 HYPOTÉZY	43
3 CÍLE PRÁCE	43
4 METODIKA	44
4.1 <i>1. PROJEKT - SROVNÁNÍ ENDOSKOPICKÉ A CHIRURGICKÉ LEČBY PACIENTŮ S „HIGH-RISK“ ČASNÝM KARCINOMEM JÍCNU A DETAILNÍ ANALÝZA UZLINOVÝCH METASTÁZ A MIKROMETASTÁZ</i>	44
4.1.1 Design studie	44
4.1.2 Definice	44
4.1.3 Pacienti	44
4.1.4 Další terapie a sledování pacientů	46
4.1.5 Histopatologické zpracování a vyhodnocení vzorků.....	46
4.1.6 Statistická analýza	48
4.2 <i>2. PROJEKT - VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMIE P53 V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU</i>	49

4.2.1	Design studie	49
4.2.2	Pacienti	49
4.2.3	Biopsie	49
4.2.4	Histopatologie	49
4.2.5	Statistická analýza	50
4.3	3. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU A ŽALUDKU	50
4.3.1	Design studie	50
4.3.2	Pacienti	50
4.3.3	Endoskopie a pCLE	50
4.3.4	Biopsie	51
4.3.5	Histopatologie	51
4.3.6	Výstupy	52
4.3.7	Statistická analýza	52
4.4	4. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE VS. BIOPSIE V DIAGNOSTICE PERZISTENTNÍ / REKURENTNÍ INTESTINÁLNÍ METAPLAZIE U PACIENTŮ PO LÉČBĚ BARRETT'S OESOPHAGUS RELATED NEOPLASIA	52
4.4.1	Design studie	52
4.4.2	Pacienti	52
4.4.3	Endoskopie a konfokální laserová endomikroskopie	53
4.4.4	Biopsie	53
4.4.5	Hlavní cíle	54
4.4.6	Statistická analýza	54
5	VÝSLEDKY	55
5.1	1. PROJEKT	55
5.1.1	Charakteristika pacientů	55
5.1.2	Výsledky chirurgické terapie a histopatologické hodnocení	56
5.1.3	Výsledky endoskopické léčby	60
5.1.4	Celkové hodnocení endoskopické a chirurgické léčby – metastázy do lymfatických uzlin, vzdálené metastázy, generalizace	61
5.2	2. PROJEKT	63
5.2.1	Charakteristika pacientů a lézí	63
5.2.2	Definitivní diagnózy stanovené histopatologicky z hematoxylin eosinu	64
5.2.3	Výsledky imunohistochemického průkazu p53	64
5.2.4	Korelace imunohistochemického průkazu p53 s definitivní diagnózou z hematoxylin eosinu	65
5.3	3. PROJEKT	67
5.3.1	Charakteristika pacientů a výkon	67
5.3.2	Diagnostická přesnost	67
5.4	4. PROJEKT	72
5.4.1	Charakteristika pacientů	72
5.4.2	pCLE a biopsie v diagnostice perzistentní/rekurentní IM	72
5.4.3	pCLE a biopsie v diagnostice rekurentní neoplazie	72
5.4.4	Diagnostická přesnost	73
5.4.5	Analýza detekovaných žlázek a pohárkových buněk	73
6	DISKUSE	75
6.1	1. PROJEKT	75
6.2	2. PROJEKT	78
6.3	3. PROJEKT	80

6.4	4. PROJEKT.....	82
7	HLAVNÍ ZÁVĚRY	86
7.1	1. PROJEKT.....	86
7.2	2. PROJEKT.....	86
7.3	3. PROJEKT.....	86
7.4	4. PROJEKT.....	86
8	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ ZABÝVAJÍCÍ SE NEMOCEMI JÍCNU	87
9	REFERENCE.....	89

SOUHRN

Úvod: Karcinom jícnu představuje celosvětově osmou nejčastější malignitu. Dva nejčastější typy jsou adenokarcinom a spinocelulární karcinom. Správná histopatologická diagnóza, staging a určení prediktivních rizikových markerů v progresi jsou klíčové pro vývoj nemoci, osud a management pacienta. Endoskopickou resekci lze považovat za kurativní léčbu v případech R0 resekce karcinomu se slizniční invazí nebo s invazí do horní třetiny submukózy. Pacienti s pokročilejšími karcinomy jsou referováni k chirurgické, případně onkologické terapii. Zlatým standardem v diagnostice je histopatologie, častokrát s využitím imunohistochemie, například s průkazem mutace genu *TP53*, který hraje důležitou roli v patogenezi progresse lézí jícnu. Velký význam mají také nové diagnostické metody, mezi které například patří konfokální laserová endomikroskopie (CLE). Neméně důležité je sledování pacientů i po endoskopické léčbě s cílem včasného a spolehlivého odhalení perzistentní či rekurentní léze.

Cíle, metody a pacienti: V práci jsou celkově zpracovány čtyři samostatné, na sebe částečně navazující projekty, s parciálním překryvem pacientů. Cíle jednotlivých projektů byly: 1) Stanovit prediktivní markery progresse karcinomu jícnu, riziko metastázování a generalizace a porovnat efektivitu endoskopické a chirurgické terapie u 65 pacientů s „high-risk“ časným karcinomem jícnu. 2) U 87 pacientů s lézí jícnu zkoumat imunohistochemický marker p53 a jeho význam v diagnostice. 3) U 65 pacientů se 74 viditelnými lézemi jícnu/žaludku srovnat diagnostickou přesnost standardních biopsií a nového principu diagnostiky („virtuální histologie“ – konfokální laserová endomikroskopie). 4) Porovnat CLE s biopsiemi v detekci perzistentní/rekurentní intestinální metaplazie a neoplazie sliznice jícnu u 56 pacientů.

Výsledky: 1) Jediným statisticky významným prognostickým faktorem generalizace a postižení lymfatických uzlin byla pozitivní invaze do krevních či lymfatických cév. Celkem 80 % endoskopicky léčených pacientů dosáhlo kompletní remise. Dlouhodobé remise bylo dosaženo u 62,9 % pacientů léčených endoskopicky. 2) Imunohistochemický průkaz p53 byl diagnostický v 73 % v diagnostice dysplastických lézí a 100 % adenokarcinomů mělo mutovaný fenotyp. 3) Diagnostická přesnost k potvrzení nebo vyloučení maligní léze byla 85 % u biopsií a 89 % u CLE. 4) Biopsie detekovaly intestinální metaplazii po endoskopické terapii v 94,6 % a u CLE ve 100 %. Diagnostická shoda mezi CLE a biopsiemi byla 94,6 %.

Závěry: 1) Invaze karcinomu do lymfatických a krevních cév se jeví jako nejvýznamnější rizikový faktor v predikci progresse karcinomu jícnu. Endoskopická terapie by mohla být vhodnou alternativou k ezofagektomii i u pacientů s pokročilejšími časnými neoplazii jícnu. 2) Imunohistochemický průkaz p53 je vhodnou pomocnou metodou v odlišení dysplastických lézí od nedysplastických. 3) CLE je porovnatelná s biopsiemi v diagnostice lézí jícnu a žaludku a mohla by být uznána jako standardní metoda v této indikaci. 4) CLE je srovnatelně přesná jako standardní biopsie v diagnostice perzistující/recidivující intestinální metaplazie a při vyloučení recidivující neoplazie. Výhodou CLE ve všech indikacích (3., 4.) oproti biopsiím je možnost

vyšetření podstatně větší plochy a hodnocení v reálném čase v průběhu endoskopie i vyškoleným gastroenterologem bez účasti patologa.

Klíčová slova: karcinom jícnu, „high-risk“ karcinom, endoskopická terapie, konfokální laserová endomikroskopie, CLE, p53

ABSTRACT

Introduction: Esophageal cancer ranks eighth among the most common malignancies worldwide. The two most common types are adenocarcinoma and spinocellular carcinoma. Correct histopathological diagnosis, cancer staging and identification of predictive risk factors of progression are important in terms of further disease course and management. While patients with mucosal carcinoma without risk factors are treated endoscopically, those with submucosal invasion or mucosal carcinoma with risk factors are referred for surgical therapy according to current recommendations. Histopathology is still considered the gold standard in diagnosis, often used in conjunction with immunohistochemistry, e.g., to document a *TP53* gene mutation, which plays an important role in the pathogenesis and progression of esophageal dysplasia. New diagnostic methods, such as confocal laser endomicroscopy (CLE), also play an important role. Other crucial factors include patient follow-up, early and reliable detection of persistent or recurrent lesions.

Aims, methods and patients: In the thesis, 4 separate, partly connected projects are assessed together, with a partial overlap of patients. The aims of the individual projects were as follows: 1) To identify predictive factors of esophageal cancer progression, risk of metastasis and generalization, and to compare the effectiveness of endoscopic and surgical therapies in 65 patients with "high-risk" early esophageal cancer. 2) p53 as an immunohistochemical marker and its significance were investigated in 87 patients with esophageal lesions. 3) The diagnostic accuracy of standard biopsies and CLE was compared in 65 patients with 74 visible esophageal/gastric lesions. 4) To compare CLE with biopsies in the detection of persistent/recurrent intestinal metaplasia and neoplasia in 56 patients.

Results: 1) The only statistically significant prognostic factor of generalization and lymph node metastasis was documented blood or lymphatic vessel invasion. A total of 80 % of endoscopically treated patients achieved complete endoluminal remission. Long-term remission was achieved in 62.9 % of patients. 2) p53 immunohistochemistry was diagnostic in 73 % of dysplastic lesions and 100 % of adenocarcinoma showed an abnormal phenotype. 3) Diagnostic accuracy to confirm or exclude a malignant lesion was 85 % for biopsies and 89 % for CLE. 4) Biopsies detected intestinal metaplasia after endoscopic therapy in 94.6 % and CLE in 100 %. Diagnostic agreement between CLE and biopsies was 94.6 %.

Conclusions: 1) Cancer invasion into lymphatic and blood vessels appears to be the most significant risk factor predicting esophageal cancer progression. Patients with mucosal carcinoma without risk factors or with carcinoma invading the upper third of the submucosa could be treated endoscopically, and the criteria limit could be shifted in these indications. 2) Immunohistochemical detection of p53 is a suitable auxiliary method, especially in differentiating dysplastic and nondysplastic esophageal lesions. 3) CLE is comparable to standard biopsies in overall diagnostic accuracy in esophageal and gastric lesions and could be recognized as a standard method in this indication. 4) The accuracy of CLE in diagnosing persistent/recurrent intestinal metaplasia and in excluding recurrent neoplasia is comparable to that of standard biopsy.

Compared to biopsy, the advantage of CLE in both indications (3rd, 4th) is examination of a significantly larger area and real-time evaluation during endoscopy even by a trained gastroenterologist without the participation of a pathologist.

Key words: esophageal cancer, high-risk cancer, endoscopic therapy, confocal laser endomicroscopy, CLE, p53

SEZNAM ZKRATEK

A+	angioinvaze, invaze do lymfatických cév
AC	adenokarcinom
APC	argon-plasma koagulace
ASGE	American Society for Gastrointestinal Endoscopy
BJ	Barrettův jícen
BORN	Barrett's Oesophagus Related Neoplasia
CER	complete endoscopic remission, kompletní endoskopická remise
CLE	konfokální laserová endomikroskopie
CR-IM	complete remission of intestinal metaplasia, kompletní remise intestinální metaplazie
CRN	complete remission of neoplasia, kompletní remise neoplazie
ER	endoskopická resekce
ESD	endoskopická submukózní disekce
FTN	Fakultní Thomayerova nemocnice
GEJ	gastroezofageální junkce
GER	gastroezofageální reflux
HD-WLE	high-definition white light endoscopy, endoskopie s vysokým rozlišením
HE	hematoxylin eosin
HGD	high-grade dysplazie, dysplazie vysokého stupně
IHC	imunohistochemie
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IM	intestinální metaplazie
L+	lymfangioinvaze, invaze do lymfatických cév
LGD	low-grade dysplazie, dysplazie nízkého stupně

LU	lymfatická uzlina, lymfatické uzliny
m	mukóza, sliznice
NBI	narrow band imaging
NPV	negative predictive value, negativní prediktivní hodnota
OKT	optická koherentní tomografie
PAS	periodic acid shiff
pCLE	probe-based konfokální laserová endomikroskopie
PPI	proton pump inhibitor, inhibitory protonové pumpy
PPV	positive predictive value, pozitivní prediktivní hodnota
SCC	spinocelulární karcinom
sm	submukóza, podslizniční vazivo
TCD	tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk

1 ÚVOD

Karcinom jícnu představuje v současnosti celosvětově osmou nejčastější malignitu (2020). V Evropě je jeho roční incidence 4,5 případů/100 000 obyvatel/rok (Zhang Y., 2013). Dvě nejčastější jednotky jsou adenokarcinom (AC) a dlaždicobuněčný (spinoocelulární) karcinom jícnu (SCC), které dohromady tvoří více než 95 % všech malignit jícnu.

Vznik obou karcinomů spojuje vznik abnormálních buněk s patologicky zvýšenou proliferací ve sliznici jícnu. Dnes je obecně přijímáno, že oba karcinomy vznikají sekvencí dysplazie → karcinom, a nelze opomenout ani vliv chronického zánětu na karcinogenezi. U obou typů karcinomů se na vzniku podílí také genetické mutace (podrobně viz dále).

Adenokarcinom i spinoocelulární karcinom metastázuje do regionálních lymfatických uzlin (LU), což v takovém případě výrazně zhoršuje prognózu pacienta. V pokročilejších stádiích se vyskytují i hematogenně šířené vzdálené metastázy (např. do jater, plic aj.). Klinicky se karcinom jícnu v časných stádiích výrazněji neprojevuje, zatímco pacienti s pokročilým karcinomem jícnu udávají většinou progresivní dysfagii, ztrátu hmotnosti a i další, často nespecifické příznaky.

1.1 Anatomie a histologie jícnu, fyziologie sliznice jícnu

Jícen je tubulární svalový orgán uložený v hrudní dutině v zadním mediastinu, přecházející bránicí skrz *hiatus oesophageus* do dutiny břišní, kde navazuje na žaludek. Jeho stěna je tvořena čtyřmi vrstvami – sliznicí, podslizničním vazivem, svalovinou a fascií či adventicií.

Sliznice, *mucosa*, se skládá z vrstevnatého nerohovějícího dlaždicového epitelu, pojivové tkáně *lamina propria mucosae* a slizniční svalové vrstvy *lamina muscularis mucosae*. Dlaždicový epitel je tvořen 1-3 vrstvami bazálních buněk, dále dlaždicovými buňkami a papilami dosahujícími do 1/2 tloušťky epitelu.

Podslizniční vazivo je tvořené pojivovou tkání a žlázkami, které vylučují hlen. Svalová vrstva *lamina muscularis propria* je tvořena dvěma vrstvami svaloviny – vnitřní cirkulární a zevní podélné, které se dále ještě liší strukturou v závislosti na lokalizaci v jícnu. Svalovina prvních 5 % proximálního jícnu je tvořena příčně pruhovaným svalstvem, dalších 30 % je tvořeno příčně pruhovaným i hladkým typem svalů. Hladké svaloviny přibývá kaudálním směrem. Poslední vrstva je v hrudní části a představuje fascii *tunica adventitia*, zatímco krátký úsek v břišní části je pokryt serózou, *tunica serosa*.

Uspořádání sliznice jícnu je v souladu s její vysokou mechanickou odolností potřebnou pro posuny potravy. Buňky sliznice jícnu, tak jako jiných orgánů lidského těla, mají geneticky naprogramovanou životnost a v pravidelných intervalech se obměňují. Rovnováha mezi zánikem a tvorbou nových buněk je zcela

klíčová pro zachování fyziologické stavby sliznice jícnu. Jakákoliv odchylka v této rovnováze vyvolá patologický stav. Pokud je převaha ve směru zvýšené proliferace nad zánikem, dochází ke vzniku neoplastických buněk a případně až ke vzniku tumoru.

Jícen je zásoben arteriální krví z arteria thyreoidea inferior, z truncus thyrocervicalis, rami bronchiales, arteriae intercostales posteriores a rami oesophagei z hrudní aorty; břišní část jícnu také z arteria gastrica sinistra. Zajímavostí je, že tepny jícnu mají dvojí základní uspořádání: I. typ je charakterizován větším počtem přírodných cév s chudým větvením, které se zanořují do svaloviny jícnu bez tvorby nápadnějších anastomos; II. typ je typický malým počtem přírodných cév, které se naopak spojují v dlouhý kmen, provázející jícen v táhlé spirále (Seichert V., Šramhauser J., 1963). Znalost těchto typů cévního zásobení a jeho respektování je doporučováno při chirurgických výkonech na jícnu.

Žíly jícnu tvoří pleteně v submukóze, které jsou mohutnější v dolní polovině jícnu a na povrchu jícnu. Krev je dále odváděna venae esophageae různými směry.

Jícen je velmi bohatý na přítomnost lymfatických cév, které jsou lokalizovány v sliznici i v submukóze. Lymfatické cévy krčního jícnu mají tributární oblasti v nodi lymphatici cervicales profundi, hrudní části v nodi tracheobronchiales a nodi mediastinales posteriores. Z břišní části jícnu jsou odváděny do nodi gastrici sinistri. Vzhledem k tomu, že lymfa je z jícnu odváděna do blízkých, ale i vzdálenějších lymfatických uzlin, metastatické postižení lymfatických uzlin nemusí vždy respektovat lokalizaci nádoru v jícnu.

Příčně pružovaná svalovina jícnu je inervována vlákny bloudivého nervu (nervus vagus) a hladká svalovina parasympatickými vlákny přes myenterický plexus (Čihák R., 2022).

1.2 Adenokarcinom

Adenokarcinom jícnu je definovaný jako maligní nádor vyrůstající z cylindrického epitelu, který produkuje hlen. Vzhledem k tomu, že sliznice jícnu je na povrchu krytá vrstevnatým nerohovějícím dlaždicovým epitelem, AC vzniká nejčastěji z metaplastické sliznice Barrettova jícnu (viz Barrettův jícen, strana 18).

Histologický obraz adenokarcinomu může být pestrý, mezi nejčastější patří tubulární/glandulární, tubulopapilární, kribriformní nebo solidní. Na základě těchto morfologických obrazů je pak stanoven jeho grading. Mezi další znak AC (ve srovnání se SCC) patří vyšší stupeň disociace nádorových buněk. Obecně lze říci, že disociace nádorových buněk vzrůstá s vyšším gradíngem karcinomu.

1.2.1 Epidemiologie

Celková roční incidence AC v zemích Evropské unie je 4,5 případů/100 000 obyvatel. V průběhu roku je tak diagnostikováno 44 000 nových případů s významnými rozdíly mezi jednotlivými státy. Nejvyšší výskyt (11/100 000) je ve Spojeném království, zatímco nejnižší (1/100 000) je v Řecku.

Nutno podotknout, že AC byl v minulosti považován za relativně vzácnou malignitu jícnu. Práce ze začátku 20. století ukázaly, že AC představoval maximálně 4 % všech malignit jícnu (Bosh A. et al., 1979) a v roce 1964 v České republice to bylo 25 % (Mařatka Z., 1964). Nejvyšší nárůst počtu AC byl pozorován během posledních 30–40 let (Blot WJ., 1994), kdy se jeho incidence zvýšila až šestinásobně. V současnosti je AC v některých vyspělých zemích (Skotsko, Dánsko) již častější než SCC (Devesa SS. et al., 1998) a očekává se další zvýšení jeho incidence. Vzestup výskytu AC se připisuje zejména zvýšenému výskytu gastroezofageálního refluxu a Barrettova jícnu, mimo jiné i v důsledku pandemie obezity. V ČR je v současnosti poměr AC: SCC cca 1:1. Incidence AC je nejvyšší u bílých mužů. Několik studií ukázalo poměr postižení bílých Američanů a Afroameričanů 5:1 (Cook M. et al., 2009). AC jícnu je v Asii považován za vzácný nádor, naopak zde jednoznačně převládá spinocelulární karcinom (viz Spinocelulární karcinom, strana 30).

1.2.2 Rizikové faktory, prekancerózy, Barrettův jícen a adenokarcinom

Existuje několik definicí Barrettova jícnu. Barrettův jícen (BJ) je prekanceróza, kterou definujeme jako náhradu dlaždicového epitelu jícnu epitelem cylindrickým s intestinální metaplazií (IM) v endoskopicky viditelném segmentu v minimální délce 1 cm v oblasti nad gastroezofageální junkcí (definice dle Standardů České gastroenterologické společnosti) (Martinek J. et al., 2013). Intestinální metaplazií rozumíme náhradu epitelu sliznice jícnu či gastroezofageální junkce (GEJ) epitelem intestinálního typu. V tomto případě platí v histopatologii pravidlo „No goblets, no Barrett’s“. Tato definice vychází ze skutečnosti, že pouhá přítomnost kardiální sliznice není pro diagnózu BJ dostačující.

Americká gastroenterologická společnost definuje BJ jako jakoukoliv náhradu dlaždicového epitelu epitelem cylindrickým s nezbytnou přítomností IM pro potvrzení diagnózy BJ (Spechler SJ. et al., 2011).

Britská gastroenterologická společnost definuje BJ jako stav, ve kterém byla jakákoli část normální distální dlaždicové epitelální výstelky nahrazena metaplastickým cylindrickým epitelem, který je jasně viditelný endoskopicky (≥ 1 cm) nad gastroezofageální junkcí a je histopatologicky potvrzen z biopsií jícnu (Fitzgerald RC. et al., 2014).

BJ definujeme endoskopicky pomocí tzv. Pražské klasifikace (tzv. C, M kritéria), která popisuje délku metaplastické sliznice, kdy číslo za písmenem M značí celkovou délku segmentu BJ a číslo za písmenem C délku cirkulárního segmentu. Pražská klasifikace je mezinárodně uznávaná a je používána většinou endoskopistů na celém světě. Jméno „Pražská“ vychází z faktu, že kritéria byla prvně představena na Evropském gastroenterologickém kongresu v Praze v roce 2004 (Martinek J. et al., 2013).

U většiny pacientů se AC jícnu vyvíjí cestou intestinální metaplazie (BJ) \rightarrow dysplazie nízkého stupně/low-grade dysplazie \rightarrow dysplazie vysokého stupně/high-grade dysplazie \rightarrow karcinom. Dysplazie vznikající v terénu BJ se označuje jako „Barrett’s Oesophagus Related Neoplasia (BORN)“.

Někteří autoři tvrdí, že výskyt cylindrického epitelu bez přítomnosti pohárkových buněk (tedy bez intestinální metaplazie) nemá jednoznačně prokázanou asociaci se vznikem AC jícnu (Chandrasoma P, 2012). Naopak

jiná skupina autorů tvrdí, že přítomnost IM není klíčová v sekvenci BJ – AC. Své tvrzení potvrdili také molekulárně-genetickými metodami (Lavery DL, 2016). Nicméně i klinická data potvrzují, že právě intestinální typ epitelu je ten, ze kterého vyrůstají buňky karcinomu.

Low-grade dysplazie je definována těmito histopatologickými znaky: mírné nakupení žlázek, žlázky bez větvení nebo s minimálním větvením, ztráta maturace, jaderná hyperchromazie, elongace a pseudostratifikace jader, mírná jaderná pleomorfie, mírná nepravidelnost chromatinu a minimální ztráta polarity. Jadérka většinou nejsou přítomna, a pokud ano, pouze v minimálním množství. Obvykle je přítomen ostrý přechod neoplastické a normální sliznice.

High-grade dysplazie je definována nepravidelnými a větvenými žlázkami odpovídajícími komplexnímu nakupení žlázek, ztrátou maturace, anizokaryózou, vezikulárními jádry, přítomností jadérek a hyperchromazií. Jadérka jsou výraznější, malá a kulatá.

1.2.3 Původ a vznik Barrettova jícnu a adenokarcinomu

Historická poznámka

Barrettův jícen je pojmenován podle významného chirurga Normana Ruperta Barretta (16. 5. 1903 - 8. 1. 1979), který svůj popis (BJ) publikoval v roce 1950 (Barrett NR., 1950). Zajímavostí jsou dvě kontroverzní informace týkající se Barrettova jícnu a N. R. Barretta samotného. Za prvé, Barrettovo vysvětlení, že se jedná o embryonální abnormalitu, nebylo správné. Za druhé, Barrett nebyl prvním, kdo náhradu dlaždicového epitelu popsal (je vhodné dodat, že N. R. Barrett nikdy netvrdil, že byl první, kdo tento jev popsal). I z těchto důvodů je eponymium Barrettův jícen některými autory vnímán přinejmenším jako kontroverzní, byť jeho užívání je již vžito. Norman Rupert Barrett strávil většinu svého pracovního života v Londýně, kde pracoval jako významný chirurg.

BJ je získanou abnormalitou, která vzniká na podkladě gastroezofageálního refluxu (GER) a lze jej detekovat u cca 10–15 % pacientů s refluxní nemocí jícnu (Bhat S. et al., 2011).

Několik teorií se snažilo během mnoha let podat vysvětlení buněčného původu BJ na animálních modelech nebo na podkladě klinických dat či pitev. V současnosti není jednoznačně známá progenitorová buňka, která způsobuje vznik BJ. Nejznámější teorie tvrdí, že buněčný původ BJ vychází z:

1. progenitorové kmenové buňky v jícnu (Kalabis J. et al., 2008);
2. submukózní jícnové žlázky (Leedham SJ. et al., 2008);
3. residuálních embryonálních buněk lokalizovaných ve skvamocelulární junkci (Wang X. et al., 2011);
4. žaludeční kardiie (Barbera M., Fitzgerald RC., 2010) nebo
5. cirkulujících buněk kostní dřevě (Sarosi G. et al., 2018).

Nutno říci, že výsledky těchto teorií, často vycházejících z experimentů, by měly být interpretovány s rezervou, jelikož jícen člověka se odlišuje od animálního.

1.2.4 Patofyziologie a patogeneze Barrettova jícnu

Sliznice jícnu se snaží adaptovat na nové prostředí GER a může přecházet fenotypickými změnami vedoucími ke vzniku nového epitelu. Vzhledem k tomuto faktu je IM někdy popisována jako projev odchylné regenerace sliznice jícnu. Na základě pozorování u pacientů i animálních modelů se zdá, že jde o několikas-tupňový proces.

Účinek žaludečních šťáv, tedy kyseliny chlorovodíkové a zejména žlučových kyselin, vede ke vzniku zánětu, po kterém může následovat vznik přechodného vrstevnatého cylindrického epitelu, ze kterého se vyvine jednovrstevný non-intestinální typ cylindrického epitelu a v konečné fázi specializovaný intestinální typ cylindrického epitelu (intestinální metaplázie). Na molekulární úrovni zde dochází k poškození DNA, které je nelineárně závislé na množství a trvání refluxu (Salo JA, Shvo E., 2003) (Spicak J. et al., 2015). Některá data ukazují, že v minulosti popisované jednotlivé fenotypy cylindrického epitelu mohou být spíše součástí mezikroků vzniku BJ, než různé, samostatné entity (Glickman JN. et al., 2001). Tyto závěry jsou podloženy rovněž molekulárními mechanismy.

Poškození DNA je pravděpodobně způsobeno reaktivními kyslíkovými radikály, jelikož buňky vystavené refluxu ztrácejí přirozené antioxidační mechanismy, které je chrání před reaktivními radikály. Mezi nejvýznamnější antioxidační mechanismy patří systém glutathion peroxidázy, a právě jeho dysfunkce byla prokázána v buňkách AC jícnu (Peppelenbosch MP. et al., 2014) (Peng D. et al., 2014).

Obecným, geneticky naprogramovaným mechanismem kontroly proliferace buněk v organismu je apoptóza. Vznikem metaplastického epitelu se buňky sliznice typu BJ stávají odolné vůči apoptóze, čímž se ztrácí kontrolní mechanismus maligního bujení, které tím podněcuje vznik karcinomu.

1.2.5 Molekulární mechanismy vzniku Barrettova jícnu / intestinální metaplázie

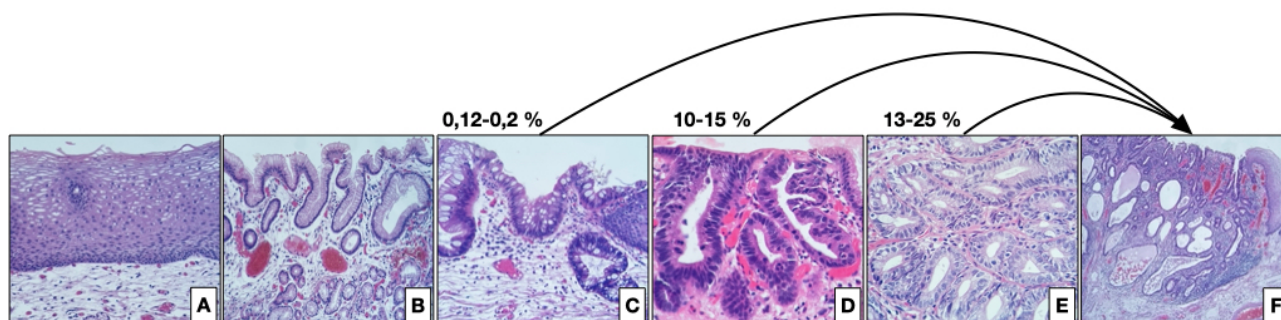
Genová exprese IM ukázala expresi mnoha genů intestinálního typu. Mezi nejdůležitější patří *CK20*, *MUC2*, *VILLIN*, které jsou regulovány homeoboxovými geny *CDX* (*CDX1* a *CDX2*) (Guo RJ. et al., 2004). Nutno říci, že *CDX2* není v normální nemetaplastické sliznici jícnu či žaludku vůbec exprimován. Mnoho studií ukázalo, že jaderná exprese *CDX2* a *CDX1* je přítomná u IM (Guo RJ. et al., 2004) (Huop X. et al., 2010) (Casumori H. et al., 2006).

V experimentu bylo prokázáno, že pokud jsou buňky lidské dlaždicové linie vystaveny kyselému prostředí a žluči, dochází ke zvýšené regulaci *CDX2* (Liu T. et al., 2007). Na základě těchto experimentů byly provedeny další studie na transgenních myších pro určení role *CDX2* na vznik IM, kde cytokeratin *CK14* působil jako promotor. Zvýšená exprese *CDX2* v tomto modelu nedokázala indukovat cylindrickou metaplázi (Kong J. et al., 2011).

Tyto výsledky ukazují, že izolovaná zvýšená exprese *CDX2* není schopna indukovat cylindrickou metaplazii v jícnu či žaludku. Naopak, zvýšená exprese *CDX2* za účasti promotoru *H+/K+ATPázy* vedla snadno k intestinální metaplazii žaludku. Chirurgický experiment ukázal, že exprese *CDX2* a *MUC2* jsou pozdější produkty, které zvýšeně regulovaly BMP4–pSMAD cestu. In vitro studie ukázaly, že pSMAD a *CDX2* formují funkční komplex, který je schopný označit *MUC2* promotor (Salo JA, Shvo E., 2003). Lze tedy říci, že funkce *CDX2* závisí na aktivní BMP4–pSMAD cestě.

1.2.6 Progrese Barrettova jícnu do adenokarcinomu

BJ je asociovaný se zvýšeným rizikem vzniku AC jícnu s roční incidencí 0,12–0,2 % u pacientů bez průkazu dysplastických změn (Martinek J. et al. , 2008) (Bhat S. et al., 2011). U pacientů s potvrzenou low-grade dysplazií (dysplazií nízkého stupně, LGD) je riziko progrese do high-grade dysplazie (dysplazie vysokého stupně, HGD) nebo do invazivního AC 10–15 % ročně. Pacienti s HGD mají riziko progrese do AC cca 13–25 % ročně (obrázek 1) (Curvers WL. et al., 2010). Dysplastické změny jsou považovány za nejspolehlivější prediktivní faktory vzniku AC jícnu. Dalším rizikovým faktorem vzniku AC je délka BJ – se zvyšující se délkou BJ roste i riziko progrese do invazivního karcinomu (Martinek J. et al. , 2008). Z těchto důvodů jsou pacienti s BJ pravidelně sledováni v rámci endoskopické surveillance (Martinek J. et al. , 2008) (Hvid-Jensen F. et al., 2011) (Kambhampati S. et al., 2020).



Obrázek 1. Schéma sekvence vzniku adenokarcinomu jícnu z normálního dlaždicového epitelu.

A. Normální dlaždicový epitel; B. Epitel typu kardie; C. Intestinální metaplazie; D. Low-grade dysplazie; E. High-grade dysplazie; F. Adenokarcinom.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Z uvedeného vyplývá, k čemu by se měl patolog vždy jasně vyjádřit (dovolím si proto doslovně citovat odstavec z kapitoly *Barrettův jícen – od diagnózy až k terapii* z učebnice *Novinky v digestivní endoskopii* (Spicak J. et al., 2015)):

Klinik má k patologovi většinou následující otázky:

1. Je přítomna specializovaná intestinální metaplazie s pohárkovými buňkami?
2. U pacientů s BJ nás zajímá, zda je nebo není přítomna dysplazie a její stupeň (LGD nebo HGD, eventuálně karcinom).
3. Přesná diagnostika a staging v případě hodnocení endoskopických resektátů.

1.2.7 Molekulární mechanismy vzniku adenokarcinomu

Progrese BJ do adenokarcinomu představuje pravděpodobně ucelený systém přechodu z prekurzorové léze do karcinomu. Ukázalo se, že roli nemá „pouze“ samotná metaplastická sliznice, ale podařilo se identifikovat somatické mutace. Dvě nejčastější mutace představují *TP53* a *PIK4CA* (Hollstein M. et al., 1991) (Watanable M., 2015).

TP53 je známý tumor-supresorový gen, kterého funkcí je zachování stability DNA a v případě potřeby opravy DNA (viz níže, Protein p53, strana 22). *PIK3CA* je kinázový aktivátor fosfoinositid-3-kinázové dráhy. Mezi další geny, které jsou signifikantně mutované u adenokarcinomu, patří *CDKN2A*, *SMAD4*, *ARID1A*, *TLR4* a *DOCK2* (Foulkes WD. et al., 1997).

Dalším mechanismem nalezeným v karcinogenezi u AC byla hypermetylace jednotlivých genů. Mezi nejdůležitější můžeme zařadit *APC*, *TIMP3*, *CDKN20*, *AKAP12* a *CDHI* (Baba Y. et al., 2013). Každý z těchto genů se podílí na jiné signalizační dráze.

Mezi další procesy podílející se na tumorigenezi jsou modifikace histonů, včetně acetylace, fosforylace nebo ubikvitinizace. Detailní mechanismy tumorigeneze jsou velmi složité a přesahují rámec tohoto textu.

1.2.8 Protein p53

Protein p53, známý jako tzv. strážce genomu, je produktem genu *TP53*, který je lokalizován na 17. chromozomu. Protein p53 funguje jako transkripční faktor a reguluje expresi různých genů, které jsou zapojené do opravy DNA a do inhibice buněčného cyklu (Levine AJ., Oren M., 2009). Protein p53 je v buňkách za fyziologických podmínek exprimován minimálně, a tím je jeho exprese zvýšena jako odezva na podněty indukující poškození DNA, tudíž buněčný stres. Následkem toho dochází k transkripci inhibitoru cyklin dependentní kinázy *CDKN1A*, dočasnému zastavení buněčného cyklu v místě kontrolního bodu G1/S a vyhodnocení stupně poškození DNA. Následně je zahájen proces opravy poškozených úseků DNA, zatímco v případě významnějších či neopravitelných poruch p53 indukuje blok buněčného dělení nebo apoptózu. Kvůli výše popsaným mechanismům je p53 označován za „strážce genomu“.

Bialelická ztráta genu *TP53* je pravděpodobně nejčastější genetickou změnou v nádorech. Testovat lze *TP53* geneticky nebo jeho produkt, protein p53, v histopatologické praxi rutinně imunohistochemicky (IHC).

Interpretace IHC p53 se osvědčila např. v diagnostice gynekologických nádorů. Někdy se p53 v „nepatologické“ komunitě nesprávně zaměňuje za tzv. proliferální marker. Nutno říci, že p53 v IHC má několik „obrazů“, myšleno jakýchsi vzorů exprese, jejichž znalost je zcela klíčová pro správné hodnocení jednotlivých lézí. Interpretace se zde nedělí pouze na dvě skupiny (negativní či pozitivní), jak jsme v imunohistochemii zvyklí, ale na tzv. normální/nemutovaný obraz a abnormální/mutovaný. Normální/nemutovaný obraz p53 je tzv. wild-type vzor, který je definován rozptýlenou, fokální variabilně slabou jadernou „pozitivitou“. Tento

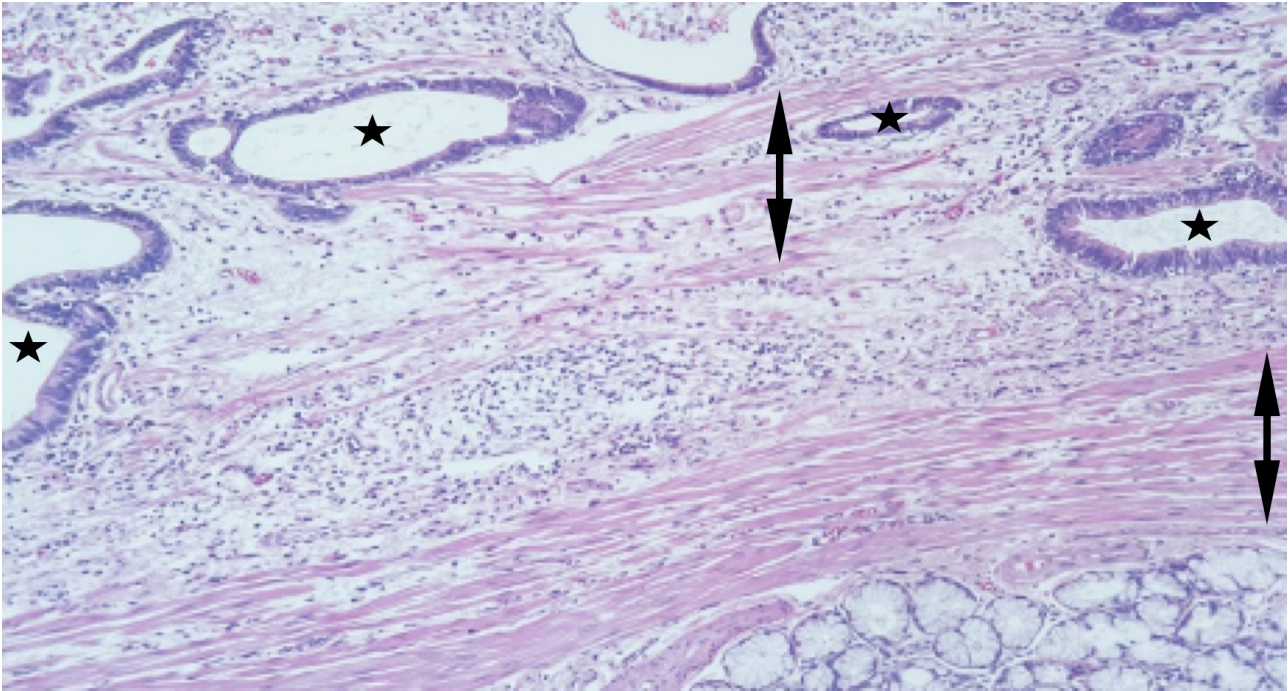
obraz nesmí být zaměněn za pozitivní či negativní, jelikož by tím došlo k jeho nesprávné interpretaci, často ve smyslu „overdiagnosis“ k závažnějším lézím (např. reaktivních změn na dysplastické). Bohužel ani mezi patology není tato informace zcela rozšířena a pravděpodobně poměrně často dochází ke stanovení nesprávné diagnózy. Tomu pak pochopitelně odpovídají následky, kdy je pacient gastroenterologem (s nejlepším úmyslem) referován k endoskopické terapii, která je v těchto případech nesprávně indikovaná.

Abnormální fenotyp může mít jeden z následujících vzorů: 1) Kompletní ztráta exprese, negativita, tzv. “nulový fenotyp”, kdy není žádná buňka pozitivní (ani slabě). Jak již bylo zmíněno, *TP53* je tumor supresorový gen, tudíž ztráta pozitivního průkazu, je očekávaný výsledek. 2) Difúzní a silná jaderná pozitivita, tzv. “bloková”, je nejčastěji asociovaná s mutacemi, která je výrazně silnější než výše zmiňovaný wild-type vzor. Tento vzor je vysvětlován tím, že některé *TP53* mutace se projeví degradací defektního proteinu, která vede k akumulaci nefunkčního proteinu, což vyústí v aberantní pozitivitu (Köbel M., Kang EY., 2001).

V tzv. jícnové problematice můžeme průkaz p53 využít ve dvou indikacích. Za prvé, k odlišení dysplastického epitelu od reaktivních změn. Použití imunohistochemického průkazu p53 v těchto případech je také doporučeno Britskými standardy (Fitzgerald RC. et al., 2014). Za druhé, některé práce ukazují, že aberantní exprese p53 i v nedysplastickém a nenádorovém epitelu koreluje se zvýšeným rizikem vzniku dysplázie vysokého stupně či karcinomu (Kastelein F. et al., 2013) (Redston M. et al., 2022) (Wang L. et al., 2016).

1.2.9 Diagnostika Barrettova jícnu

Diagnóza BJ je stanovena na základě makroskopie/endoskopie s následnou histologickou verifikací. Endoskopicky je patrný červený či lososově zbarvený viditelný segment metaplastické sliznice jdoucí nad GE junkci alespoň v délce 1 cm. V histopatologii je kromě výše zmíněné přítomnosti pohárkových buněk (intestinální metaplazie) specifickým morfologickým znakem „duplikace” lamina muscularis mucosae (obrázek 2), která se ve zdravé sliznici jícnu či v případě jiných onemocnění jícnu nevyskytuje (Abraham SC. et al., 2007). Znalost tohoto morfologického znaku je klíčová pro správné hodnocení hloubky invaze AC, a tudíž pro správný staging. Pokud je např. horní vrstva lamina muscularis mucosae hodnocena jako jediná, budou nádorové buňky pod touto vrstvou automaticky hodnoceny jako submukózní invaze, i když se reálně jedná „pouze” o invazi ve sliznici, tj. mezi dvěma vrstvami rozdvojené svaloviny ve sliznici. To může mít závažné následky, zejména při indikaci k chirurgii.



Obrázek 2. Duplikace lamina muscularis mucosae a adenokarcinom jícnu mezi vlákny svaloviny.
Šipky označují svalovinu; * označuje struktury adenokarcinomu.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

1.2.10 Sledování (surveillance) pacientů s Barrettovým jícnem

Hlavním cílem endoskopického sledování pacientů s BJ je časná detekce preneoplastických či neoplastických lézí. Při včasném záchytu neoplazie je možné pacienty zcela vyléčit. Tito pacienti tak mají mnohem lepší prognózu ve srovnání s pacienty, u kterých byl karcinom zachycený mimo program sledování (Wong T. et al., 2010). Zásadní je při endoskopii nepřehlédnout časné léze, proto je důležité důkladné prohlédnutí celého segmentu metaplastické sliznice s oplachem od případných nečistot či hlenu. Toto prohlédnutí by mělo trvat alespoň 5-7 minut a BJ by měl být popsán podle zmíněné Pražské klasifikace.

V endoskopii se navíc používá chromodiagnostika a virtuální chromoendoskopie, které do určité míry přispívají k lepší detekci lézí. V chromodiagnostice je nejpoužívanější barvení 2% kyselinou octovou, při jejíž aplikaci dochází k bělavému zbarvení BJ na podkladě denaturace intracelulárních cytoplazmatických proteinů (Longcroft-Wheaton G. et al., 2013). Dysplastické oblasti se pak odbarvují rychleji oproti nedysplastickým úsekům sliznice, čímž je lze snadněji endoskopicky detekovat.

Pokud je u pacienta detekována refluxní ezofagitida, je nezbytná léčba blokátory protonové pumpy a zopakování endoskopie s biopsiemi po 6–8 týdnech (cílem je zhojení ezofagitidy), jelikož může dojít k záměně zánettlivých změn za dysplastické.

Intervaly pravidelných endoskopických kontrol se liší v závislosti na délce segmentu BJ. Pacienti s krátkým segmentem BJ bez dysplazie (do 3 cm) podstupují kontroly v intervalu 3–5 let, přičemž interval

prvních dvou endoskopií je 6–12 měsíců. Pacienti s dlouhým segmentem nad 3 cm podstupují endoskopii každé 2–3 roky.

U pacientů s LGD je nutná kontrolní gastroscopie s odstupem 6 měsíců a navíc je dle doporučení České gastroenterologické společnosti potřebné druhé čtení histologie expertním patologem (Martinek J. et al., 2013). V případě potvrzené LGD je v současnosti indikována endoskopická léčba (radiofrekvenční ablace) nebo intenzivní surveillance, a to každých 6 měsíců.

Pacienti s prokázanou HGD jsou stejně jako pacienti s časným karcinomem indikováni k endoskopické léčbě (Martinek J. et al., 2013).

Během endoskopického vyšetření se odebírají čtyřkvadrantové biopsie každé 2 cm ze segmentu BJ k detekci možných dysplastických změn dle klasického „Seattle protokolu“ a dále cílené biopsie z každé makroskopicky viditelné léze, které je možné případně i pominout, pokud je provedena endoskopická resekce (ve smyslu pravidla, že každá „časná“ léze jícnu má být odstraněna endoskopicky a odeslána k histopatologickému vyšetření ke stanovení přesné diagnózy) (Fitzgerald RC. et al., 2014) (Spechler SJ. et al., 2011).

Správná diagnóza z biopsií je klíčová pro další léčbu pacienta. V jedné z našich studií jsme ukázali, že samotné biopsie nejsou dostatečně přesné k diagnóze neoplazií jícnu, proto by měla být každá makroskopicky viditelná léze snesena endoskopickou resekci, vzhledem k tomu, že hodnocení resekatů je mnohem spolehlivější. Diagnóza stanovená z biopsií ve srovnání s definitivní diagnózou z ER se lišila až ve 42 % (Stefanova M. et al., 2013). „Downstaging“ původní diagnózy směrem k nižšímu stupni byl zastižen v 37 %, zatímco „upstaging“ k vyššímu stupni postižení až v 63 %. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že cílené biopsie nejsou vždy dostatečné pro přesnou diagnózu neoplazií jícnu.

1.2.11 Doplnující zobrazovací modality

1.2.11.1 Konfokální laserová endomikroskopie

Konfokální laserová endomikroskopie (CLE) je relativně nová endomikroskopická zobrazovací metoda umožňující histopatologickou diagnózu v reálném čase bez invazivního způsobu odběru vzorků (tzv. optickou biopsii) (Dunbar BK., 2013) (Wallace BM. et al., 2010).

Aktuálně se využívá systém na bázi tzv. probe-based CLE (pCLE), kdy je endomikroskopická sonda přiložena k vyšetřované tkáni a na monitoru je vidět histopatologický obraz. Sonda může být zavedena skrze endoskop či cholangioskop nebo jednoduše přiložena k cílové tkáni (obrázek 3BCD).

Zajímavostí je, že objevitelem a zakladatelem Mauna Kea Technologies, která pCLE vyrábí, je Francouz Sacha Loiseau, který se svými kolegy spolupracoval na několika projektech pro Národní úřad pro letectví a vesmír (National Aeronautics and Space Administration - NASA). Hlavním projektem, který ovlivnil jeho

směřování k vývoji pCLE, byl vývoj technologie generující obrazy nejjemnějších objektů vzdálených od Země.

Nutno zmínit, že princip konfokální laserové endomikroskopie není nový a již dříve byl k dispozici endoskop, ve kterém byla CLE zabudovaná fixně, tzv. endoscope-based CLE. Hlavní nevýhoda tohoto systému ve srovnání s pCLE byla zcela zřejmá – endomikroskopii bylo možné provést pouze lumenem gastrointestinálního traktu, tedy místy dosažitelnými endoskopem. Od používání i výroby tohoto systému bylo tedy upuštěno (Kopáčová M. et al., 2007) (Kopáčová M. et al., 2009).

pCLE využívá fyzikální princip konfokálního mikroskopu, kde je zdrojem světla laser, který skrze preparát osvětluje konfokální clonu. Tímto systémem prochází světlo i emitované fluorescenční záření odrážené od preparátu. U pCLE procházejí laserové paprsky optickými vlákny sondy, které jsou následně zpracovány softwarem, vytvářející celkový obraz potřebný k hodnocení histologie. Histopatologický obraz se hodnotí přímo na monitoru soustavy pCLE, tzv. věže (obrázek 3A). Součástí této soustavy je i tiskárna, což umožňuje přiložení fotografie suspektní léze patologovi, který může záznam sekvence dále hodnotit off-line, či gastroenterologovi.

Dvě až tři minuty před vyšetřením pCLE se pacientovi intravenózně aplikuje fluorescenční látka – fluorescein (s absorpčním maximem při 494 nm a světlo emituje při 512 nm). Prakticky ihned po aplikaci je možné začít s vyšetřováním pacienta. Před každým požitím pCLE dochází automaticky ke kalibraci a jeho správné nastavení se projeví „blikáním“ sondy nazelenalou barvou (obrázek 3C). Nesprávná kalibrace se projeví nedostatečnou kvalitou obrazu, která se dá snadno napravit opakovanou kalibrací přístroje. Před každým vyšetřením i po něm je sonda pochopitelně pečlivě dezinfikována.

pCLE dokáže zobrazit epiteliální, event. i subepiteliální struktury při 1000násobném zvětšení v jakékoli části trávicího traktu. Výhodou tedy může být rychlá diagnóza v reálném čase (v průběhu endoskopie nebo ihned po výkonu) a vyšetření mnohem větší plochy oproti standardním biopsiím. V případě komplexních či větších lézí může být záznam hodnocen softwarově off-line, kde mohou být jednotlivé struktury přiblíženy či dokonce změřeny, což může diagnostiku upřesnit.

Další nespornou výhodou pCLE je fakt, že diagnózu může stanovit kromě patologa i endoskopista. Jak endoskopista, tak i patolog však musí podstoupit speciální trénink, jelikož obrazy v pCLE nejsou přesným odrazem histopatologického nálezu.

Na základě studií je pCLE validována v diagnostice (a event. i endoskopické surveillance) pacientů s BJ. pCLE má vysokou senzitivitu a specificitu v detekci IM, HGD a AC jícnu (Sharma P. et al., 2011). Je sporné, zda-li se pCLE v této indikaci prosadí, jelikož odběr biopsií v jícnu nečiní zásadní potíže a cena pCLE je zatím vysoká.

Na druhé straně, pCLE může být vhodnou metodou v diagnostice spinocelulárních karcinomů jícnu, které jsou lokalizovány v oblasti proximálního jícnu, kde je odběr biopsií složitější a vzorky jsou občas nevýtěžné (Kollar M. et al., 2018).

Je aktuální otázkou, zda je konfokální laserová endomikroskopie (virtuální biopsie) srovnatelná s biopsiemi v diagnostice viditelných lézí jícnu a žaludku a zda může být použita jako standardní metoda v diagnostice časných neoplazií jícnu či žaludku. I z tohoto důvodu jsme provedli studii, ve které jsme srovnávali diagnostickou přesnost standardních biopsií s virtuálními biopsiemi (pCLE), přičemž definitivní diagnóza byla stanovena z endoskopických či chirurgických resekátů (viz projekt 3).

Další indikace pCLE v lékařství

pCLE se využívá ve více než 470 nemocnicích po celém světě v mnohých oborech lékařství a rozsah jejího použití stále narůstá. Některé indikace pCLE v USA jsou již hrazeny ze zdravotního pojištění.

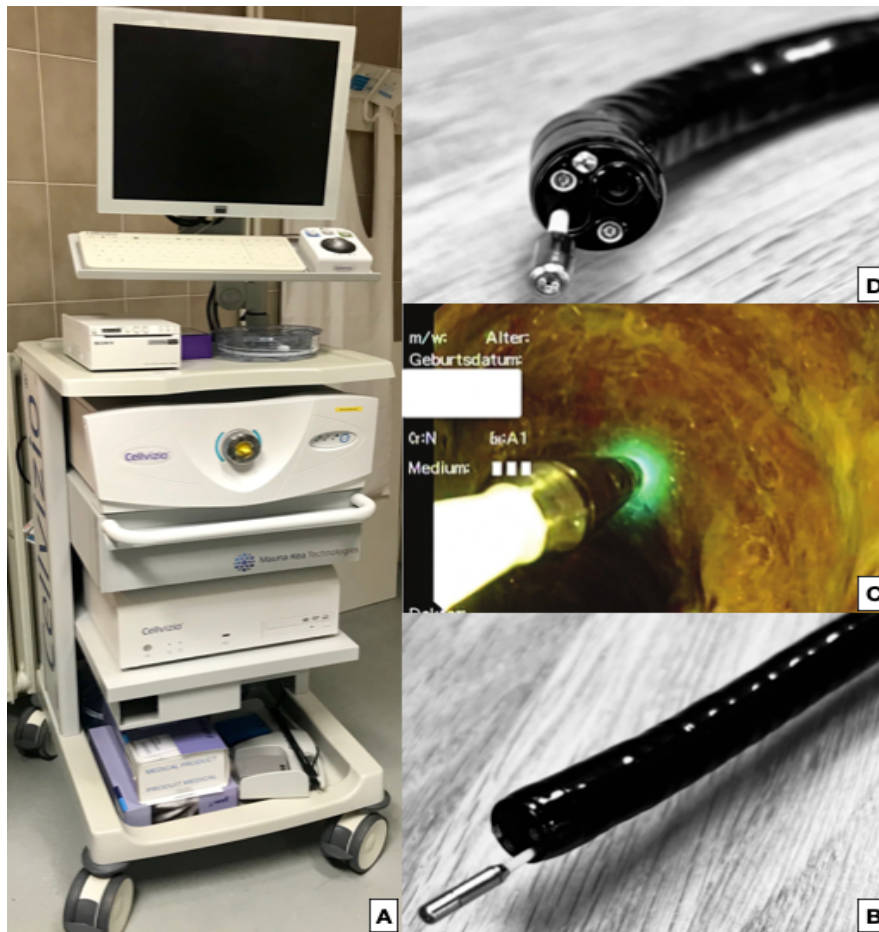
V gastroenterologii má pCLE slibné výsledky v diagnostice lézí žaludku (Li WB. et al., 2011) a také v diagnostice žaludeční IM ve srovnání s vysoko-rozlišovací endoskopií (Li Z. et al., 2014) (Lim LG. et al., 2013) (Guo YT, 2008).

Další slibné využití pCLE se jeví v diagnostice pankreatických, zvláště cystických lézí, jelikož aspirační biopsie z pankreatických lézí mají často omezenou výtěžnost (Brugge WR. et al., 2004) (Napoleon B. et al., 2015) (Nakai Y. et al., 2015).

Podobná situace nastává rovněž v diagnostice indeterminovaných biliárních striktur, kde materiál získaný pro histopatologické hodnocení bývá rovněž častokrát nevýtěžný, což může představovat pro patologa diagnostické obtíže. V těchto indikacích byla již pCLE schválena v doporučeních ASGE (American Society for Gastrointestinal Endoscopy) (Anderson MA. et al., 2013).

pCLE také poskytuje slibné výsledky v diagnostice bronchogenních karcinomů (Fuchs FS. et al., 2013), intersticiálních plicních procesů (Fuchs FS. et al., 2011) či v diagnostice chronické obstrukční plicní choroby (Newton RC. et al., 2010).

Velmi zajímavým použitím pCLE je určení přítomnosti/nepřítomnosti nádorových struktur v resekčních okrajích při neurochirurgických výkonech (Belykh E. et al., 2020).



Obrázek 3. Probe-based konfokální laserová endoskopie.

A. Kompletní soustava, tzv. věž. B.D. Pohled na sondu zasunutou kanálem endoskopu. C. Správně kalibrovaná sonda. Pohled na sliznici tenkého střeva u pacientky po multiviscerální transplantaci s denudovaným epitelem. Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

1.2.11.2 Optická koherentní tomografie

Optická koherentní tomografie (OKT) je další doplňkovou neinvazivní optickou metodou v diagnostice gastrointestinálních lézí v průběhu endoskopie s vysokým rozlišením úrovně mikroskopu s nízkým rozlišením. Fyzikální princip je analogický s ultrazvukem, s tím rozdílem, že OKT nepoužívá k snímání tkání akustické vlny, ale infračervené světlo. Tento princip umožňuje pronikat signálu hlouběji do tkáně, a to 1–3 mm, což představuje její hlavní výhodu ve srovnání s pCLE (Sivak MV. et al., 2000). Systém je založen na tzv. nízko-koherentní interferometrii (Brand S. et al., 2000) (Bouma BE. et al., 2000), díky které je možné dosáhnout vyšší rozlišovací schopnosti a tudíž jako jediná metoda umožňuje tzv. průřezovou vizualizaci vrstev stěny orgánu v reálném čase s vysokým rozlišením. Na základě interferenčního signálu pak počítač dokáže rekonstruovat data do konečného obrazu. Stejně jako pCLE je považována za tzv. virtuální histologii.

Hlavní nevýhodou první verze byla pomalá rychlost získávání obrazu, přičemž použití nové metody zajistilo znatelně vyšší rychlost zobrazování (Yun S. et al., 2003). V současnosti je používána další generace

OKT, tzv. volumetrická laserová endomikroskopie (frekvenční tomografie), která dokáže v průběhu 90 sekund naskenovat 6 cm úsek jícnu v rozlišení 10 µm. Podobně jako u pCLE je negativem její vysoká cena.

Evans JA a kol. ukázali, že OKT v diagnostice lézí jícnu má potenciál identifikovat IM a HGD (Kohli DR. et al., 2017). Jiná studie prokázala senzitivitu 82 % a specificitu 74 % v počítačově podporovaném algoritmu pro diagnostiku dysplastické sliznice BJ na základě současných kritérií (Qi X. et al., 2006). Tato metoda se v České republice nepoužívá.

1.2.11.3 Autofluorescence

Autofluorescence je přirozená schopnost emise světla tkáněmi, pokud jsou tyto ozářeny světlem, které absorbují. Nejčastějšími zdroji autofluorescence jsou nikotin amid adenin dinukleotid (NAD), kolagen, riboflavin či elastin. Schopnost sliznice vyzařovat autofluorescenční záření klesá se stupněm patologických změn, což způsobí, že tkáň BJ se barví zeleně a dysplazie či karcinom fialově (Spicak J. et al., 2015). Stefanová a kol. publikovali studii, kde sledovali přínos autofluorescence v diagnostice LGD, HGD a časného AC jícnu. Specificita autofluorescence byla u HGD 94 % a u karcinomů 90 %, naopak u LGD byla specificita 76 % a senzitivita 53 %, jelikož velké procento případů bylo falešně pozitivních (Stefanová M. et al., 2011). Navíc, všechny HGD a karcinomy patrné v autofluorescenci, byly rovněž viditelné i v běžném bílém světle, tudíž použití autofluorescence nevedlo ke zvýšenému zachytu těchto lézí. Podobné výsledky ukázala i další, zahraniční studie (Boerwinkel DF. et al., 2013).

1.2.12 Antirefluxní léčba pacientů s Barrettovým jícnem

Dlouhodobý nekontrolovaný GER je hlavním rizikovým faktorem vzniku BJ a AC. Podle recentních doporučení většiny odborných gastroenterologických společností mají být pacienti s BJ léčeni antirefluxně, tj. buď inhibitory protonové pumpy (PPI, proton-pump inhibitor) v dávce nezbytné ke kontrole refluxních příznaků nebo fundoplicací (Martinek J. et al., 2013) (Fitzgerald RC. et al., 2014) (Spechler SJ. et al., 2011). Někteří autoři navíc doporučují provedení pH metrie při léčbě protonovými inhibitory k vyloučení významného zbytkového refluxu.

Antirefluxní léčba je důležitá, neboť je prokázáno, že léčba PPI snižuje riziko vzniku AC u pacientů s BJ (Parkin DM. et al., 1988) (Steevens J. et al., 2010). Antirefluxní terapií by měli být zajištěni i pacienti bez aktuálních refluxních příznaků, což je u pacientů s BJ vcelku obvyklé.

Na druhou stranu je vhodné zmínit, že existují také studie, které naznačují, že léčba inhibitory protonové pumpy může naopak zvýšit riziko vzniku jiných nádorů (např. karcinom žaludku - díky vlivu hypergastrinemie způsobené léčbou PPI) ve srovnání s populací bez léčby (Nason KS. et al., 2011) (Abrahami D. et al., 2022).

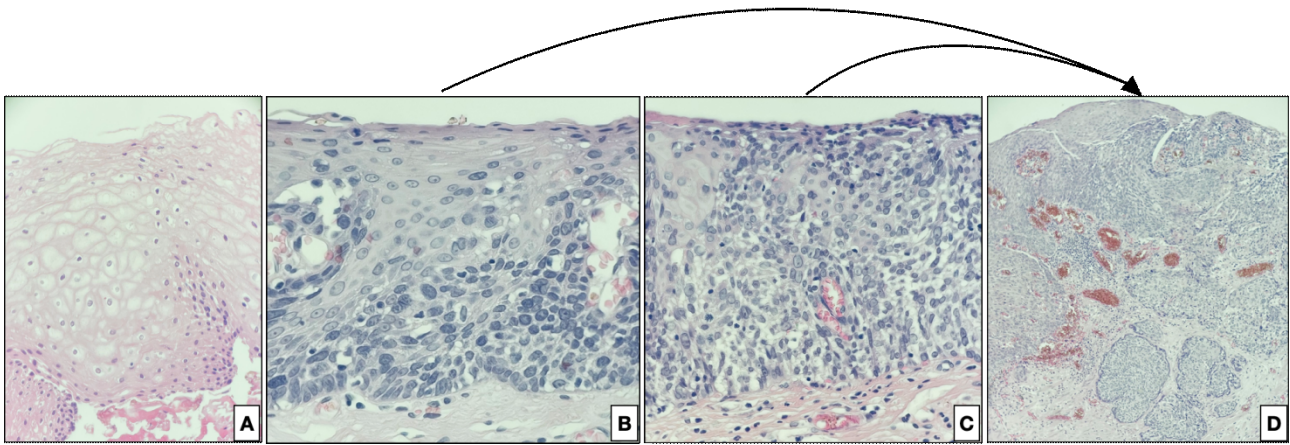
Fundoplikace představuje alternativu dlouhodobé léčby PPI. K fundoplikaci jsou obvykle indikováni pacienti s refluxními symptomy, zatímco pacienti bez refluxních příznaků nejsou vhodnými kandidáty. Literární data o účinku fundoplikace ve snížení rizika vzniku AC nejsou na rozdíl od podávání PPI jednoznačná (Tran T. et al. , 2005) (Tuuli M.E. Kauttu et al., 2011). Navíc účinnost fundoplikace nemusí být dlouhodobá, např. Spechler a kol. publikovali retrospektivní studii, kde ukázali, že až 62 % pacientů léčených fundoplikací se muselo v průběhu následujících 10 let vrátit k farmakoterapii a opět užívali antisekreční léčbu (Spechler SJ. et al., 2001). O fundoplikaci jako jediném správném řešení refluxních potíží a zároveň i ochraně proti malignímu zvratu jsou obvykle přesvědčeni někteří chirurgové, zatímco někteří gastroenterologové mají naopak tendenci pacienty k fundoplikaci neindikovat vůbec (Spicak J. et al., 2015). Je zřejmé, že ani jeden z výše popsaných postupů není správný. Nicméně i pacienty s BJ je po provedené fundoplikaci potřeba sledovat endoskopicky vzhledem k riziku vzniku AC.

1.3 Spinocelulární karcinom

Spinocelulární karcinom jícnu je definovaný jako maligní nádor vyrůstající z vrstevnatého dlaždicového epitelu a může vznikat sekvencí skvamózní dysplazie nízkého stupně (skvamózní LGD) → skvamózní dysplazie vysokého stupně (skvamózní HGD) → spinocelulární karcinom (obrázek 4).

SCC může být nerohovějící, rohovějící nebo může mít určitý podíl rohování. Tento nádor má obecně vyšší kohezivitu buněk než AC a tudíž menší tendenci k disociaci nádorových buněk. Oproti AC jícnu je biologicky agresivnější.

Skvamózní dysplazie nízkého stupně je definovaná přítomností lehkých dysplastických změn epitelu dosahujících do dolní třetiny až poloviny dlaždicového epitelu, zatímco při dysplastických změnách vysokého stupně dosahují dysplastické změny až do horní třetiny epitelu, resp. až k povrchu a rovněž jsou častější mitózy. Invaze přes bazální membránu z definice však není zastižena.



Obrázek 4. Schéma sekvence vzniku spinocelulárního karcinomu jícnu z dlaždicového epitelu.

A. Normální dlaždicový epitel jícnu; B. Skvamózní low-grade dysplazie; C. Skvamózní high-grade dysplazie; D. Spinocelulární karcinom.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

1.3.1 Epidemiologie

V roce 2012 představoval v celosvětovém měřítku SCC 88 % všech karcinomů jícnu. Incidence SCC jícnu se v jednotlivých geografických oblastech značně liší. SCC se v některých oblastech světa (Asie) vyskytuje endemicky. Incidence SCC v ČR se pohybuje kolem 0,9–1,4/100 000 obyvatel. V některých státech Evropy, jako např. Portugalsku, Španělsku a Itálii, je incidence nižší: 0,2–0,9/100 000 obyvatel. Na druhou stranu, v Německu, Francii, Švýcarsku jsou hodnoty vyšší, s maximem ve Velké Británii - 1,4–2,5/100 000 obyvatel. Nejvyšší hodnoty dosahují endemické oblasti v severním Íránu, střední Asii a v některých oblastech Číny, kde se pohybují kolem 20–140/100 000 obyvatel. Tato oblast se někdy označuje jako „pás rakoviny jícnu“ (Parkin DM. et al., 1988). Geografická distribuce SCC se výrazně liší nejen napříč zeměmi, ale i v jednotlivých zemích, kde lze v incidenci nalézt až desetnásobné rozdíly. Tento trend je zdokumentovaný např. v Číně, kde jsou rozdíly ve výskytu SCC velké v relativně krátkých vzdálenostech. Vysoká incidence SCC je rovněž v severovýchodním Íránu. Jednoznačné vysvětlení tohoto fenoménu neexistuje (Steevens J. et al., 2010) (Chen W. et al., 2016) (Islami F. et al., 2004).

Zajímavým faktem je poměr postižených mužů a žen. Ve Spojených státech jsou muži postiženi 4x častěji než ženy, zatímco v již zmíněných vysoce postižených oblastech Číny a Íránu je to téměř 1:1 (Arnold M. et al., 2015). Přibližně ve 12 zemích jsou dokonce ženy postižené častěji než muži. Tento zajímavý fakt se vysvětluje právě rozdílnými rizikovými faktory – v USA či Evropě je hlavním faktorem rizika kouření a alkohol, a muži kouří a pijí více než ženy, naopak v endemických oblastech tyto tradiční rizikové faktory nejsou – a roli hraje genetika a faktory prostředí.

1.3.2 Etiologie

Etiologie SCC je multifaktoriální. Nejčastější rizikové faktory vzniku SCC jsou faktory zevního prostředí, jako abúzus nikotinu a alkoholu, nízký socioekonomický status, konzumace malého množství zeleniny a ovoce, pití horkých nápojů, špatná ústní hygiena či asociace s jinými nemocemi, jako jsou tylóza či achalázie (Engel LS. et al., 2003) (Zendejdel K. et al., 2008) (Salaspuro MP., 2003) (Abnet CC. et al., 2018) (Prabhu A. et al., 2014).

Ukazuje se, že typ požívaného alkoholu má pravděpodobně rovněž vliv na vznik SCC. Tzv. tvrdý alkohol (destiláty) může představovat vyšší riziko vzniku než pivo nebo víno, nicméně se zdá, že důležitější je kumulativní množství alkoholu (Tuyns AJ. et al., 1979). Léta diskutovaný enzymatický vliv alkoholdehydrogenázy na lidský organismus může hrát jistou roli v patogenezi karcinomu jícnu. Obecně platí, že pacienti, u kterých je nižší hladina alkoholdehydrogenázy, mají vyšší citlivost vůči alkoholu. Z uvedeného vyplývá, že individuální náchylnost k alkoholu hraje pravděpodobně významnou roli.

Známým faktem je, že pacienti s nikotinismem a abúzem alkoholu mají často malignitu tzv. aerodigestivní oblasti. Zajímavostí je, že často bývají postiženi druhým, synchronním maligním tumorem právě v oblasti GIT. S abúzem alkoholu a nikotinismem je logicky spojena i horší ústní hygiena.

Několik studií v Asii odhalilo asociace SCC s určitými chemickými sloučeninami obsaženými v potravinách. Šlo zejména o N-nitroso sloučeniny, které se vyskytují hlavně v uzeninách či v nesprávně upraveném mase (spálení). Vznikají v těle zejména při nedostatku vitamínu C (Cheng SJ. et al., 1982) (Siddiqi M. et al., 1988).

Dosud bylo popsáno několik jednotek, které lze pokládat za prekancerózy/stavy asociované s výrazně vyšším rizikem vzniku SCC. Mezi ně patří achalázie, tylóza (součást Howelova-Evansova syndromu), kausťická striktura, Plummerův-Vinsonův (Kelly-Patersonův) syndrom, infekce lidským papilomavirem (Human Papilloma Virus, HPV) a infekce virem Ebstein Barrové (EBV).

Su H. a kol. ukázali, že exprese genů u SCC jícnu se ve familiárních a sporadických případech odlišovala a rodinná anamnéza SCC zvyšuje riziko jeho vzniku (Su H. et al., 2003).

1.3.3 Molekulární mechanismy vzniku spinocelulárního karcinomu

Z molekulárně-genetického hlediska je SCC ve srovnání s AC mnohem hůře definovaný. Jak bylo zmíněno výše, SCC vzniká v sekvenci zánět → dysplazie → SCC, přičemž většina molekulárně-genetických abnormalit je detekována již ve stádiu dysplastických změn.

Mezi významné alterace patří zejména inaktivace tumor supresorového genu. Časnou změnou je mutace genu označovaného jako *PDCD4* (Programmed Cell Death 4), který kóduje protein programované

buněčné smrti 4 (Programmed Cell Death Protein 4), čímž vede ke zvýšené odolnosti buněk vůči apoptóze. Mezi další tumor supresorové geny patří gen *TP53* a *CDKN2A*.

Dalším mechanismem je mutace genu produkujícího enzym odpovědný za opravu poškozených úseků DNA, tudíž produkt zcela zásadní pro stabilitu genomu. Tento gen se označuje jako *MGMT* (O-6-methylguanin-DNA-methyltransferáza) a jeho produkt se označuje jako alkylguaninová DNA alkyltransferáza.

Narušený mechanismus opravy DNA, který vede k významnému nárůstu genových alterací, je způsoben také mutací/dysregulací enzymů skupiny APOBEC (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme).

Nelze též opomenout zvýšenou expresi/amplifikaci genů pro transkripční faktory, které jsou spojené s regulací pluripotentních kmenových buněk. Sem patří zejména gen *SOX2* a *TP63*.

Další cytogenetickou abnormalitou jsou změny v počtu chromosomů.

1.3.4 Diagnostika

SCC se typicky manifestuje progresivní dysfagií, v počátcích zejména pro tuhou stravu, v pozdějších stadiích i pro tekutiny. V případě exulcerovaného karcinomu udává menší část pacientů odynofagii. Mezi další klinické projevy patří hemateméza a/nebo meléna. Typickým projevem pokročilého SCC je v pozdějších stadiích kachektizace pacientů.

Endoskopické vyšetření je klíčové pro diagnostiku SCC. Identifikace prekancerózních lézí v dlaždicovém epitelu charakteru low- i high-grade dysplazie může být v průběhu endoskopie obtížná, a to i při využití endoskopu s vysokým rozlišením. Je proto doporučeno používat chromoendoskopii s Lugolovým roztokem. Dysplastické a maligní časně léze jsou identifikovány jako Lugol-negativní, jelikož neobsahují glykogen. Pokročilé nádory se vyznačují specifickým maligním vzhledem, který lze spolehlivě diagnostikovat již endoskopickým vyšetřením. Vyznačují se exofytickým růstem do lumen s typickými miskovitým tvarem. Definitivní diagnóza je stanovena z histopatologie.

1.4 Časný karcinom jícnu

Karcinomy jícnu podle pokročilosti dělíme na časně a pokročilé. Časný karcinom jícnu je definovaný jako karcinom, který prorůstá maximálně do submukózy, tj. neprorůstá do vlastní svaloviny. Přibližně 20 % všech diagnostikovaných karcinomů jícnu jsou časně karcinomy. K jejich charakteristice patří i absence lymfadenopatie či vzdálených metastáz.

Časný karcinom jícnu se na základě hloubky invaze v histopatologii dále dělí. V případě AC rozdělujeme 4 stupně slizniční invaze m1 – m4: invaze do lamina propria mucosae, intramukózní karcinom (m1); invaze do horní vrstvy duplikované svaloviny (m2); invaze do prostoru mezi vlákna duplikované svaloviny (m3);

invaze do dolní vrstvy duplikované svaloviny (m4). Invazi AC do submukózy (sm) dělíme na sm1 – sm3: karcinom prorůstá do horní třetiny submukózy nebo je hloubka invaze $\leq 500 \mu\text{m}$ (sm1); karcinom prorůstá do střední třetiny submukózy (sm2); karcinom prorůstá do dolní třetiny submukózy (sm3).

U SCC je situace odlišná, jelikož u SCC nedochází k duplikaci svaloviny jako v případě AC. Slizniční invaze je tedy rozdělena do tří vrstev, m1 – m3: karcinom *in situ* (m1); invaze do lamina propria mucosae (m2); invaze do lamina muscularis mucosae (m3). Definice invaze karcinomů do submukózy je v podstatě stejná jako u AC: karcinom s invazí do horní třetiny nebo s hloubkou invaze $\leq 200 \mu\text{m}$ (sm1); invaze do střední třetiny submukózy (sm2); invaze do dolní třetiny (sm3).

Důležitým faktorem je, že časný karcinom lze často léčit i zcela vyléčit endoskopicky, tj. bez nutnosti operace. Endoskopická léčba pro slizniční AC se slizniční a se submukózní (sm1) invazí je uznávanou metodou první volby. U SCC je situace obdobná, léze však musí být odstraněna en-bloc, neboť SCC je biologicky agresivnější a jedině en-bloc resekce umožní kompletní histopatologický staging. V případě AC je resekce en-bloc taktéž vhodná, i když je podle doporučených postupů akceptovatelná i piece meal ER (Pimentel-Nunes P. et al., 2022).

Časný karcinom jícnu se dále dělí na tzv. „low-risk“ a „high-risk“, tedy „nízko“ a „vysoko“ rizikový karcinom. Existují různé definice lišící se v jednotlivých studiích. V zásadě má „high-risk“ karcinom velkou pravděpodobnost generalizace a pacienti by měli být léčeni chirurgicky nebo onkologicky. Low-risk karcinomy lze naopak léčit endoskopicky. Kde přesně leží hranice mezi endoskopickou a chirurgickou léčbou je předmětem diskuzí a též tématem jedné z našich studií (viz dále).

Manner H. a kol. (Manner H. et al., 2013) definovaly „low-risk“ AC následovně: makroskopicky polypoidní nebo plochá léze, histologicky prokázaná invaze max. do sm1, dobrá nebo střední diferenciací (G1-G2), bez známek angioinvaze či lymfangioinvaze. Karcinomy, které nesplňovaly nejméně jedno z uvedených kritérií, byly automaticky hodnoceny jako „high-risk“ karcinomy a nebyly do studie zařazeny.

V naší studii byl „high-risk“ karcinom jícnu definován jako jakýkoliv AC i SCC s invazí do submukózy (sm1-3) nebo slizniční karcinom s minimálně jedním z následujících znaků: špatná diferenciací až dediferenciací (G3-G4), angioinvaze do krevních cév, lymfangioinvaze či vysoká disociace nádorových buněk.

1.4.1 Kritéria indikace a kurability endoskopické léčby

V tabulce 1 jsou shrnuta kritéria kurability při endoskopické terapii časných neoplázií jícnu (Martinek J. et al., 2013).

Nutno zmínit, že na základě endoskopického nálezu není možné spolehlivě predikovat detailní biologickou povahu, staging a případné riziko metastazování, proto je endoskopický zákrok metodou, která umožňuje přesný histopatologický staging a na jeho základě je indikována buď další endoskopická terapie (je-li nezbytná, nebo se může resekce považovat za kurativní), nebo léčba chirurgická či adjuvantní onkologická terapie. Hranice endoskopické léčby jsou určeny na základě rizika postižení lymfatických uzlin zejména v závislosti na

hloubce invaze karcinomu (tabulka 1). Čím hlubší je invaze karcinomu, tím vyšší je riziko metastatického postižení lymfatických uzlin (tabulka 2) i vzdálených metastáz.

Tabulka 1. Kritéria endoskopické léčby časných neoplazií jícnu.

	Obecně lze považovat za kurativní	Obecně indikováno k následné chirurgické/onkologické léčbě	“Hraniční stavy”
AC	<ul style="list-style-type: none"> - se slizniční invazí - s R1 resekcí (pozitivita lat. okrajů) s max. slizniční invazí, pokud endoskopista garantuje makroskopické odstranění léze piece-meal technikou (tj. R0 resekce není nezbytnou podmínkou prohlášení resekce za kurativní). - R0 resekce s sm1 invazí 	<ul style="list-style-type: none"> - karcinomy s sm2-3 invazí - méně diferencované karcinomy (G2-3) s sm1 invazí - špatně diferencované nebo nediferencované karcinomy (G3-4), s hlubokou slizniční invazí (m4) invazí nebo karcinomy s nepříznivými histologickými vlastnostmi (TCD, invaze do cév) 	<ul style="list-style-type: none"> - karcinomy dobře diferencované s R1 resekcí (piece-meal, invaze sm1) - sm2 invaze, R0 resekce, dobrá diferenciacie (u těchto nemocných lze zvážit dokončení endoskopické léčby s následnou dispenzarizací nebo indikovat chirurgický výkon)
SCC	<ul style="list-style-type: none"> - s R0 resekcí, s m1-3 invazí, dobře diferencované a bez lymfangioinvaze 	<ul style="list-style-type: none"> - sm 2-3 invaze - R1 resekce - horší diferenciacie 	<ul style="list-style-type: none"> - sm1 invaze, R0 resekce

Zkratky: AC – adenokarcinom; G – grading; sm – submukóza; SCC – spinocelulární karcinom. TCD – tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk.

1.4.2 Riziko generalizace na základě hloubky invaze nádoru

TNM klasifikace (Tumor, Node, Metastasis) je mezinárodně platná klasifikace, která slouží k jednoduchému popisu rozsahu nádorového postižení a určení stádia onemocnění. Hloubka invaze nádoru a pozitivita či negativita regionálních lymfatických uzlin jsou dva nejdůležitější prognostické faktory. Rice a kol. ukázali, že parametr T je významný prediktor parametru N u pacientů s karcinomem jícnu. Tyto faktory, jak je dobře známo z histopatologické praxe, souvisí kromě hloubky invaze také s diferenciací tumoru (Rice TW. et al., 1998).

Karcinomy se slizniční invazí jsou v TNM klasifikaci na základě histopatologického hodnocení klasifikovány jako pT1a, karcinomy se submukózní invazí jako pT1b a karcinomy s invazí do vlastní svaloviny jako pT2.

Tabulka 2. Riziko postižení lymfatických uzlin na základě hloubky invaze nádoru (Maes S. et al., 2018).

	AC	SCC
Invaze m1	0 %	0–1 %
Invaze m2	0 %	0–6 %
Invaze m3 (m4)	0–5 %	1–9 %
Invaze sm1	1–8 %	8–27 %
Invaze sm2	16–35 %	15–35 %
Invaze sm3	16–69 %	45 %

Zkratky: AC – adenokarcinom; sm – submukóza; SCC – spinocelulární karcinom

1.4.3 Endoskopické modalitty léčby Barrettova jícnu a časných karcinomů jícnu

V minulosti byli pacienti s BJ s HGD nebo časným karcinomem indikováni k chirurgické resekci jícnu (byla-li technicky možná) a pacienti s LGD nebo bez známek dysplazie byli pravidelně sledováni. Podobný přístup byl aplikován rovněž u pacientů s dlaždicobuněčnými neoplaziiemi.

Významný zlom v léčbě těchto pacientů v posledních letech přinesl rozvoj endoskopických metod. Tyto metody umožňují přesnější diagnostiku než biopsie a po endoskopické resekci či submukózní disekci následuje přesný histopatologický staging. Tyto metody mohou poskytnout kurativní léčbu bez nutnosti další chirurgické nebo onkologické léčby. V případě nekurativního endoskopického zákroku jsou pacienti po endoskopické terapii referováni k chirurgickému výkonu a/nebo i onkologické léčbě (např. karcinomy v proximálním jícnu), případně pokračují v endoskopické terapii, pokud jsou k ezofagektomii kontraindikováni.

Endoskopická léčba má ve srovnání s chirurgickou léčbou mnohem nižší morbiditu a mortalita je nulová. U pacientů léčených chirurgicky může mortalita dosahovat až 10 % (Gockel I. et al., 2005).

Metodami endoskopické léčby časných neoplazií jícnu jsou endoskopická resekcce (ER), endoskopická submukózní disekce (ESD) a ablační metody zahrnující radiofrekvenční ablacii (RFA), „hybridní“ argon-plasma koagulaci (APC), kryoterapii či fotodynamickou léčbu.

Doporučení gastroenterologických společností (American College of Gastroenterology, 2016; British Society of Gastroenterology, 2013; Česká gastroenterologická společnost, 2013) upřednostňují endoskopickou léčbu před ezofagektomií u pacientů s časným karcinomem jícnu.

1.4.3.1 Indikace k endoskopické léčbě a surveillance

Barrettův jícen bez dysplazie

Pacienti s BJ bez dysplazie jsou endoskopicky sledováni v pravidelných intervalech. Pacienti s BJ do 3 cm jsou po úvodních dvou endoskopiích bez prokázané dysplazie indikováni k endoskopické kontrole každých 3–5 let. Pacienti s BJ nad 3 cm po dvou negativních endoskopiích jsou indikováni každé 2–3 roky. V této skupině není indikována endoskopická terapie, individuální případy mohou být eventuálně léčeni radiofrekvenční ablací nebo kryoablací.

Barrettův jícen s LGD

Pacienti s definitivní diagnózou LGD (potvrzenou druhým čtením patologem centra specializovaném v problematice časných neoplazií jícnu) jsou indikováni k endoskopické léčbě, většinou k radiofrekvenční ablací. V případě viditelných lézí či krátkého segmentu BJ je indikována ER. Alternativou je intenzivní (každých 6 měsíců) endoskopická surveillance.

Barrettův jícen s HGD

Zde je jednoznačně indikována endoskopická léčba. U lézí s HGD lze použít endoskopickou resekci, RFA nebo kombinaci obou metod v libovolném pořadí. Jakákoliv viditelná léze musí být odstraněna endoskopickou resekci.

Časný adenokarcinom jícnu

U pacientů s časným AC jícnu je indikována endoskopická terapie. Modality endoskopické léčby zahrnují ER či ESD, které mají význam v přesné diagnostice i histopatologickém stagingu a u části pacientů má kurativní charakter. Každý pacient po ER či ESD musí být individuálně diskutován v rámci multidisciplinárního týmu ke stanovení dalšího terapeutického postupu. U pacientů s AC léčeného ER nebo ESD je indikováno další pokračování endoskopické léčby (většinou RFA), pokud není indikována chirurgická léčba. Cílem léčby je nejenom odstranění neoplázie, ale též eradikace BJ, což snižuje riziko vzniku metachronních neoplazií.

LGD a HGD dlaždicového epitelu (skvamózní LGD a HGD)

U těchto lézí je indikována endoskopická léčba (ER, ESD či RFA), případně lze jednotlivé metody kombinovat.

Časný spinocelulární karcinom

V případě agresivnějších a větších (nad 10 mm) SCC je doporučovaná metodou ESD, která umožňuje odstranění lézí en-bloc s nutností provést R0 resekci. ESD poskytuje resekát pro spolehlivé histopatologické

vyšetření a staging. Piece-meal resekce není u SCC vhodnou metodou. RFA je v případě SCC kontraindikovaná.

Níže je uveden podrobnější popis jednotlivých endoskopických metod (obrázek 5).

Ablační metody

Ablační techniky sliznice BJ zahrnují RFA, APC, kryoterapii či fotodynamickou léčbu. V současnosti je RFA nejpoužívanější ablační modalitou a je považována za standardní metodu léčby pacientů s BJ na podkladě její účinnosti a bezpečnostního profilu.

Fyzikálním principem RFA je změna polarity elektrod přístroje vyvolávající pohyb nabitých částic tkáně. Tepelný účinek energie destruuje všechny vrstvy sliznice a neprostupuje do submukózy, jelikož energie proniká do hloubky 1000 μm . Vzhledem k tomu není s RFA spojené vysoké riziko stenóz.

V terapii BJ se používají systémy HALO360, HALO90, HALO60 a HALO TTS (through the scope). HALO360 se využívá u cirkumferenční RFA. Balon je pokrytý 30 mm dlouhou bipolární elektrodou je umístěný na distálním konci endoskopu. Na začátku vyšetření se provádí kalibrace měřicím balonem ke stanovení velikosti průměru jícnu. HALO90 a HALO60 jsou elektrody obdélníkového tvaru využíváné v terapii krátkého segmentu BJ či ložiskových metaplastických ostrůvků.

RFA se provádí v celkové anestezii nebo analgosedaci a probíhá vždy pod endoskopickou kontrolou. Na začátku je sliznice BJ opláchnuta vodou a mukolytikem. Účinnost RFA byla prokázána ve velké studii z roku 2009, kde byla IM eradikována v 77 %, LGD v 90 % a HGD v 81 % (Shaheen NJ. et al., 2009). Rekurence se pohybují do 13 % u IM a u 2 % v případě dysplazie (Orman ES. et al., 2013).

Nejčastější nežádoucí účinky zahrnují bolesti na hrudi, ojediněle stenózy či vzácně krvácení. Ablační léčba neposkytuje klíčovou informaci o histologii.

Endoskopická resekce

Pomocí ER je možné odstranit menší léze jícnu do 15 mm vcelku (tzv. en-bloc) nebo větší léze ve více částech, tzv. piece-meal. Hlavní nevýhodou piece-meal resekce je, že se patolog nemůže spolehlivě vyjádřit k pozitivitě či negativitě resekčních okrajů, zejména horizontálních.

Dvě nejčastější metody ER používané v jícnu jsou:

- EMRC – endoskopická (mukózní) resekce s využitím “capu” (endoscopic mucosal resection with cap)
- EMRL – endoskopická (mukózní) resekce s využitím ligátoru (endoscopic mucosal resection with ligator)

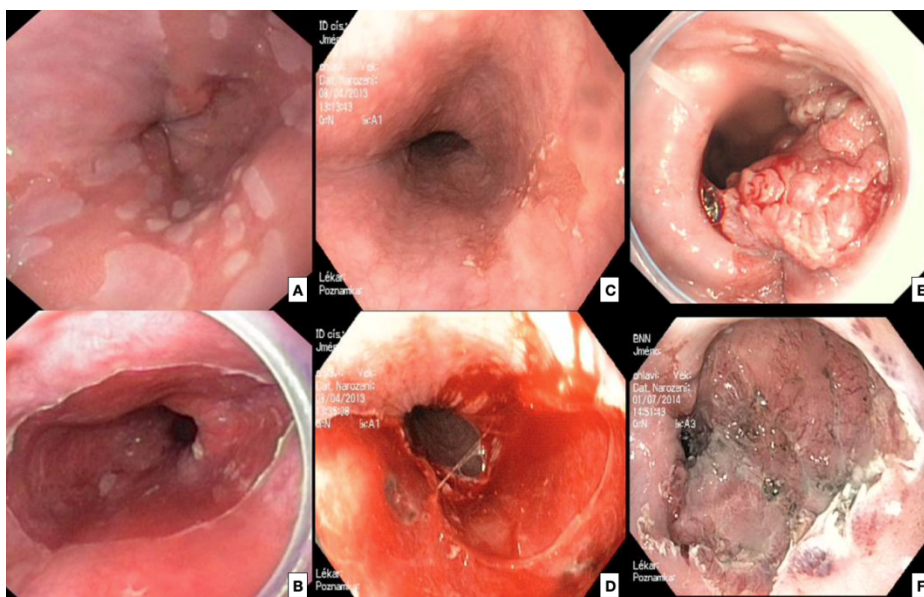
Endoskopická submukózní disekce

ESD umožňuje odstranit en-bloc i léze velké několik centimetrů pomocí speciálního nože k endoskopické disekci. Nevýhodou ESD je technická a časová náročnost výkonu a vyšší riziko perforace. V případě odstranění větších lézí jícnu se zvyšuje riziko vzniku striktur. Zásadní výhodou en-bloc resekce je precizní histopatologický staging ze strany patologa.

Kombinace ER/ESD s RFA

Jednotlivé resekční a ablační metody lze kombinovat a právě kombinace ER (nebo ESD) s RFA je v současnosti považována za zlatý standard léčby pacientů s časným karcinomem jícnu v terénu BJ. RFA je možné kombinovat v libovolném pořadí, přičemž většinou ER předchází RFA. V případě návaznosti těchto dvou léčebných modalit v terapii u jednoho pacienta je vhodné jejich provedení na stejném pracovišti (Spicak J. et al., 2015). Cílem kombinované léčby je nejenom odstranění neoplázie (BORN), ale úplná eradikace Barrettova jícnu, čímž se snižuje riziko recurence neoplázie.

V případě, že nejsou přítomné makroskopické známky reziduální metaplastické sliznice, další pokračování endoskopické léčby není nutné.



Obrázek 5. Modality endoskopické léčby.

Radiofrekvenční ablace: A. Segment Barrettova jícnu. B. Stav po aplikaci série radiofrekvenční energie. Endoskopická resekce: C. Endoskopický pohled na IIc lézi. D. Stav po terapii endoskopickou resekci. Endoskopická submukózní disekce: E. Léze charakteru 0-Is. F. Stav po léčbě.

Zdroj: Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

1.5 Rekurence Barrettova jícnu po léčbě a problematika sledování

Pacienti s dysplazií potvrzenou specializovaným patologem jsou kandidáti endoskopické terapie (blíže viz výše Endoskopické modality léčby Barrettova jícnu a časných karcinomů jícnu, strana 36).

Naše studie publikovaná Krajčiovou J. a kol. (Krajciová J. et al., 2019) z roku 2019 z České národní databáze ukázala, že z celkového počtu 134 pacientů s neoplazií související s BJ, kteří podstoupili endoskopickou léčbu (RFA / RFA+ER / RFA+ESD), až 98,5 % pacientů dosáhlo kompletní remise neoplázie (complete remission of neoplasia, CRN) a 77,9 % pacientů dosáhlo kompletní remise IM (complete remission of IM, CR-IM).

Recidiva neoplazie byla pozorována u 4,5 % (6/134) pacientů a IM u 15 % (16/106) pacientů; 7 pacientů mělo makroskopickou recidivu BJ. Zajímavostí je, že většina pacientů s perzistentní nebo rekurentní IM neměla makroskopicky viditelný BJ, tudíž lze spekulovat, že IM (perzistující/recidivující) v rámci normální neo-Z-linie nemusí pravděpodobně představovat rizikový faktor pro progresi.

Velmi podobná data publikoval Orman a kol. (Orman ES. et al., 2013) v metaanalýze 18 studií, kde analyzovali 3802 pacientů po léčbě. CRN bylo dosaženo u 91 % pacientů a CR-IM u 78 %. Recidiva neoplazie byla pozorována u 9 pacientů, z toho 4 s karcinomem, a recidiva IM u 13 %.

Z uvedených dat vyplývá velmi důležitá informace: recidivy byly zachyceny díky endoskopickému sledování a tito pacienti byli následně úspěšně léčeni endoskopicky (re-RFA nebo ER). Pacienti po endoskopické léčbě bez dalšího endoskopického sledování by velmi pravděpodobně progredovali až do stádia karcinomu.

1.6 Problematika tzv. “buried glands”

RFA je standardní ablační metoda k eradikaci metaplastické/dysplastické sliznice BJ s cílem zabránění další progresi (viz strana 38). Ošetření pacienta RFA však přináší riziko potenciální perzistence reziduálních oblastí kolumnárního epitelu pod neo-skvamózním epitelem. Tato situace je známá pod pojmem “buried glands” / “buried Barrett’s esophagus”, nebo “pohřbené žlázy” / “pohřbený BJ”. Hlavním problémem její přímnosti pod dlaždicovým epitelem je možná progresi do neoplastických lézí, případně až do AC, což dokládá například práce Titi M. a kol. (Titi M. et al., 2012). O významu důkladného sledování pacientů po terapii a uznávané, byť vzácné komplikaci vzniku “buried glands”, pojednává též práce Kohoutové D. a kol. (Kohoutova D. et al., 2015). Ukazuje, že u 2 % (7/288) pacientů po léčbě RFA a fotodynamickou terapií byl detekován subskvamózní invazivní adenokarcinom u jednoho pacienta, dále u pěti pacientů intramukózní karcinom nebo HGD a jeden pacient vyvinul AC s metastázami do jater.

Z důvodu nečastých, ale možných recidiv BJ i BORN je doporučeno pacienty po skončení léčby endoskopicky sledovat (a mimo to i léčit antirefluxní medikací), intervaly endoskopických kontrol záleží na vstupní diagnóze (tj. nejčastěji u karcinomu).

1.7 Histopatologie – zpracování a hodnocení vzorků z ER/ESD, staging

Endoskopický resektát by měl být vždy zpracován histopatologicky specializovaným gastrointestinálním patologem centra (nebo patologem specializovaným v problematice časných neoplazií jícnu). Výsledek histopatologického vyšetření určí definitivní diagnózu i přesný staging a na jeho základě je určen další

postup sledování nebo léčby pacienta.

Endoskopicky získaný vzorek (vzorky) se přišpendlí na korkovou destičku, přičemž špendlíky nemají procházet lézí a endoskopistou je provedena fotodokumentace. Vzorek je fixován v 10% roztoku formalínu pro histopatologické vyšetření.

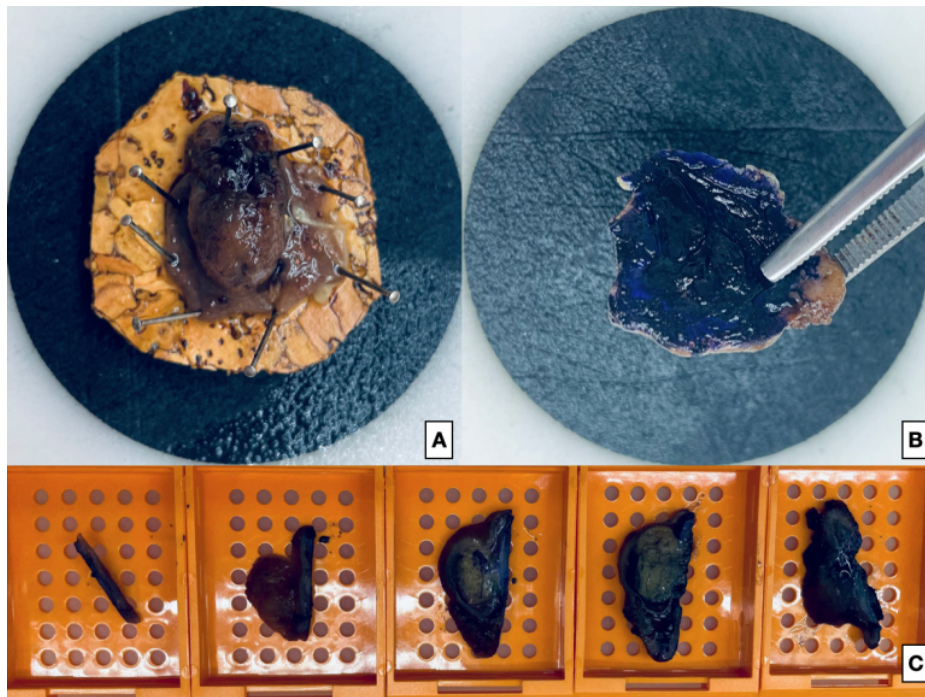
Patolog v průběhu zpracování vzorek popíše, změří, nabarví okraje a spodinu léze a rozdělí ho na 1–2mm řezy. Tímto způsobem je vzorek vždy zpracován kompletně (obrázek 6). V případě složitějšího reliéfu (nepravidelný tvar a/nebo povrch léze) a nepravidelných okrajů tumoru je vhodné nakreslit vzorek na průvodku a označit, kde jsou vedeny jednotlivé makroskopické řezy, případně je to možné provést i elektronicky. Následně je tkáň zalita do parafínu a dále nakrájena na 3–4µm řezy, barvena hematoxylinem-eosinem (HE) a dle zvyklostí jednotlivých pracovišť či v případě potřeby je barvena i dalšími barvenými, nejčastěji alcianovou modří či alcianovou modří dobarvenou Periodic Acid Schiff-em (PAS).

Hodnocené histopatologické parametry:

- histologický typ nádoru (typing)
- diference nádoru, grading (G1 – G4)
- hloubka invaze (AC: m1 – m4, sm1 – sm3; SCC: m1 – m3, sm1 – sm3)
- disociace nádorových buněk – tumor cell dissociation (TCD: 1 – 3)
- lymfangioinvaze: pozitivní (L+), negativní (L-)
- angioinvaze: pozitivní (A+), negativní (A-)
- okraje vzorku: laterální – horizontální (negativní – HM0, pozitivní – HM1) a
spodní – vertikální (negativní – VM0, pozitivní – VM1)
VM a HM spolu vypovídající o kompletním resekcčním okraji (R0/R1).

U karcinomů s invazí do submukózy se provádí histopatologické měření těchto parametrů:

- hloubka invaze nádoru – od nejhlubšího vlákna spodní vrstvy *lamina muscularis mucosae* k nejhlubšímu místu invaze nádoru
- vzdálenost nejhlubších nádorových buněk elementů k linii řezu (vertikální okraj)
- hloubka invaze v submukóze
- šířka tumoru



Obrázek 6. Zpracování endoskopického resektátu.

A. Vzorek přišpendlený na korek. B. Označení spodiny a resekčních okrajů tuší.

C. Jednotlivé makroskopické řezy lézí v sérii připravené pro zalití do parafínu a další zpracování.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

2 HYPOTÉZY

1. Riziko metastáz či mikrometastáz do lymfatických uzlin je u pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu nižší, než se předpokládá, a tudíž by bylo možné rozšířit kritéria indikace endoskopické léčby ve smyslu její kurability.
2. Protein p53 je v určitých indikacích významným imunohistochemickým markerem v diagnostice LGD a v predikci progresu dysplastických změn (= intraepitelových neoplazií) jícnu.
3. Konfokální laserová endomikroskopie může být srovnatelná s tradiční histopatologií v hodnocení (diagnostice) mikroskopické povahy viditelných časných lézí jícnu a žaludku.
4. Konfokální laserová endomikroskopie může být srovnatelná s biopsiemi v diagnostice perzistentní/rekurentní intestinální metaplázie sliznice jícnu a rekurentní neoplázie po předchozí endoskopické léčbě časně neoplázie.

3 CÍLE PRÁCE

1. Hlavním cílem práce je analýza histopatologických rizikových faktorů pokročilosti „high-risk“ časného karcinomu jícnu ve smyslu rizika metastatického i mikrometastatického postižení lymfatických uzlin a rizika generalizace a dále srovnání výsledků endoskopické a chirurgické léčby u těchto pacientů.
2. Stanovit význam imunohistochemického průkazu p53 produktu tumor supresorového genu *TP53* v diagnostice lézí jícnu a stanovení rizika progresu dysplastických změn jícnu.
3. Zhodnotit přínos konfokální laserové endomikroskopie v mikroskopické diagnostice viditelných lézí jícnu a žaludku.
4. Porovnat konfokální laserovou endomikroskopii s biopsiemi v detekci perzistentní/rekurentní intestinální metaplázie sliznice jícnu a rekurentní neoplázie po endoskopické léčbě BORN.

4 METODIKA

4.1 1. PROJEKT - SROVNÁNÍ ENDOSKOPICKÉ A CHIRURGICKÉ LÉČBY PACIENTŮ S „HIGH-RISK“ ČASNÝM KARCINOMEM JÍCNU A DETAILNÍ ANALÝZA UZLINOVÝCH METASTÁZ A MIKROME-TASTÁZ

4.1.1 Design studie

Monocentrická, retrospektivní analýza prospektivně sbíraných dat. Cílem studie bylo 1) zhodnotit a porovnat dlouhodobé výsledky endoskopické a chirurgické léčby u pacientů s „high-risk“ časnými karcinomy jícnu; 2) zhodnotit riziko generalizace u těchto pacientů; 3) posoudit možné histopatologické prediktory nepříznivého průběhu onemocnění ve snaze o optimalizaci léčebné strategie.

4.1.2 Definice

„High-risk“ časný karcinom jícnu byl definován jako adenokarcinom či dlaždicobuněčný karcinom jícnu se submukózní (T1b) invazí nebo se slizniční (T1a) invazí s minimálně jedním rizikovým faktorem. Mezi tyto rizikové faktory patřily nízká diferenciacie nádoru (G3–G4), invaze do krevních (A+) či lymfatických cév (L+) a vysoký stupeň disociace nádorových buněk – TCD3 (nejvyšší stupeň ztráty kohezivity představující izolované nádorové buňky ve stromatu).

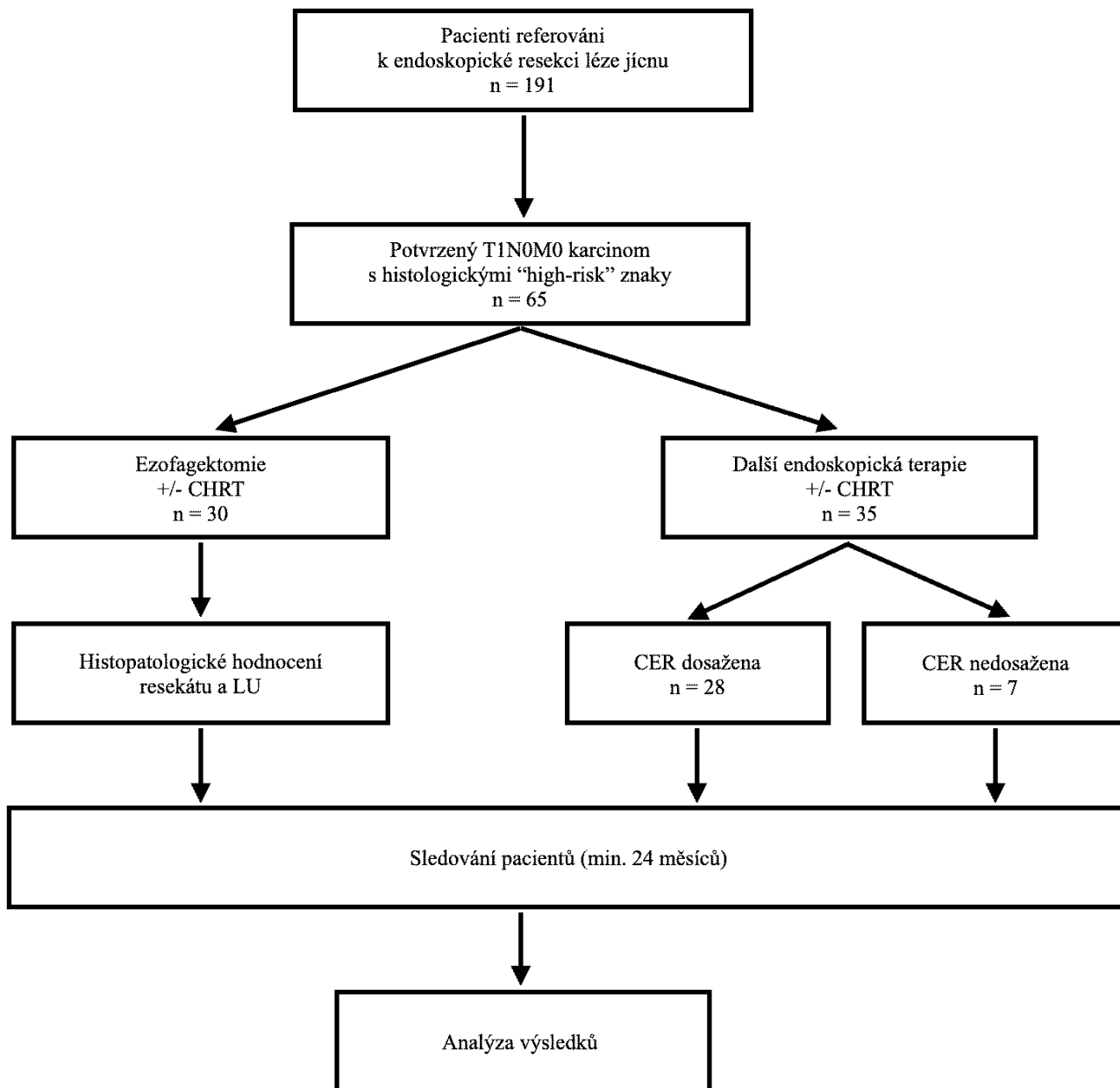
Při histopatologickém vyšetření byly karcinomy se submukózní invazí rozděleny podle hloubky invaze do 3 podskupin: sm1, sm2, sm3.

Kompletní endoskopická remise (complete endoscopic remission, CER) byla definována: 1) resekční okraje (horizontální i vertikální) endoskopického resektátu byly bez nádorových struktur (R0 resekce) a během dvou po sobě jdoucích kontrol po výkonu nebyla přítomna žádná reziduální neoplazie makroskopicky a nebyla zastižena ani mikroskopicky po provedení náhodných biopsií; 2) pacienti s pozitivním horizontálním a/nebo vertikálním resekčním okrajem (R1 resekce) po dalším ošetření (ER, ESD, RFA či onkologická léčba) s minimálně 2 po sobě následujícími kontrolami bez makroskopického či histologického průkazu rezidua tumoru. Dlouhodobá remise byla definovaná jako CER trvající alespoň 24 měsíců sledování.

4.1.3 Pacienti

V období od ledna 2004 do března 2019 byli na Kliniku hepatogastroenterologie v IKEM referováni pacienti s časnou neoplázií jícnu ve formě viditelné léze, kteří podstoupili endoskopickou terapii (ER či ESD). Endoskopické resektáty byly vyšetřeny dvěma specializovanými gastrointestinálními patologi a pacienti, kteří splnili kritéria “high-risk” časného karcinomu a byla u nich vyloučena generalizace onemocnění (CT hrudníku a břicha, endosonografie), byli zařazeni do této studie. Pacienti s “high-risk” karcinodem jícnu bez

kontraindikací byli indikováni ke standardní chirurgické terapii (první skupina). Pacienti, kteří nebyli z důvodu kontraindikace (komorbidity, vysoký věk) či z důvodu osobní preference operování, byli dále léčeni endoskopicky (či pouze endoskopicky sledováni, druhá skupina). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Přehled je uveden na obrázku 7.



Obrázek 7. Přehled pacientů, léčby a design studie.

Zkratky: CER – complete endoscopic remission, kompletní endoskopická remise; CHRT – chemoradioterapie; LU – lymfatické uzliny

4.1.4 Další terapie a sledování pacientů

Do analýzy bylo zařazeno 65 pacientů. Všem pacientům, kteří nebyli kontraindikováni k chirurgické terapii, byla jako preferovaná možnost nabídnuta ezofagektomie s lymfadenektomií. Ezofagektomii podstoupilo 30 pacientů, dalších 35 pacientů pokračovalo v endoskopické terapii či v pouhém sledování, části z nich byla nabídnuta onkologická léčba – radioterapie či chemoradioterapie (s paliativní, resp. „adjuvantní“ intencí). Endoskopické terapeutické modalitty sestávaly z endoskopické resekce, endoskopické submukózní disekce a radiofrekvenční ablace. Po dosažení CER pacienti absolvovali pravidelné endoskopické kontroly s odběrem biopsií k detekci potenciální recidivy každých 3–6 měsíců v průběhu prvních dvou let a poté jednou ročně. K detekci možné generalizace bylo v prvním, druhém a pátém roce prováděné kontrolní CT hrudníku a břicha. Generalizace byla definována jako přítomnost nádorových struktur v lymfatických uzlinách a ve vzdálených orgánech (tj. mimo jícen a GEJ, např. v játrech).

Pacientům bez dosažené CER bylo nabídnuto paliativní endoskopické ošetření (např. argon-plasma koagulace, metalický jícnový stent) a/nebo paliativní onkologická léčba a tito pacienti byli nadále jednou ročně klinicky sledováni.

Pacienti léčení chirurgicky absolvovali klinické kontroly s endoskopií každých 6 měsíců po dobu 2 let a následně jednou ročně.

4.1.5 Histopatologické zpracování a vyhodnocení vzorků

Každá endoskopicky odstraněná léze byla zpracována a vyhodnocena specializovaným gastrointestinálním patologem centra pro problematiku časných neoplazií jícnu a diagnóza/staging byly nezávisle potvrzeny druhým specializovaným patologem.

Endoskopický resekát: Endoskopický resekát byl přichycen na korkovou destičku, odeslán ve formálnínu na histopatologické vyšetření, byl změřen a popsán, eventuálně byl vzorek s jednotlivými makroskopickými řezy nakreslen a byla pořízena fotodokumentace. Vertikální a laterální (horizontální) okraje byly barevně označeny, makroskopicky byl vzorek excidován na 2–3 mm fragmenty a dále nakrájen na mikrotomu na cca 3 µm silné řezy. Byla provedena barvení HE a Alcianovou modří s PASem.

Chirurgický resekát: Veškerý chirurgický materiál byl popsán, změřen a vyšetřen standardním unifikovaným protokolem. Resekční okraj jícnu a žaludku byl kompletně zpracován a vyšetřen. Jícen a GEJ byly zpracovány v maximálních rozestupech 10 mm a obarveny HE. Lymfatické uzliny byly zpracovány níže popsaným způsobem.

Lymfatické uzliny. Všechny LU odstraněné během chirurgického zákroku byly zpracovány ve dvou po sobě následujících krocích. Každá LU byla vyšetřena podle protokolu pro vyšetřování sentinelových lymfatických uzlin.

1) Menší LU byly makroskopicky rozděleny na dvě poloviny, větší uzliny byly v celém rozsahu rozděleny žiletkou na cca 5 mm silné řezy. Všechny LU byly makroskopicky zpracovány kompletně. Poté byly vzorky zalaty do parafinu. Tento krok zpracování proběhl na Ústavu patologie a molekulární medicíny Fakultní nemocnice Motol a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

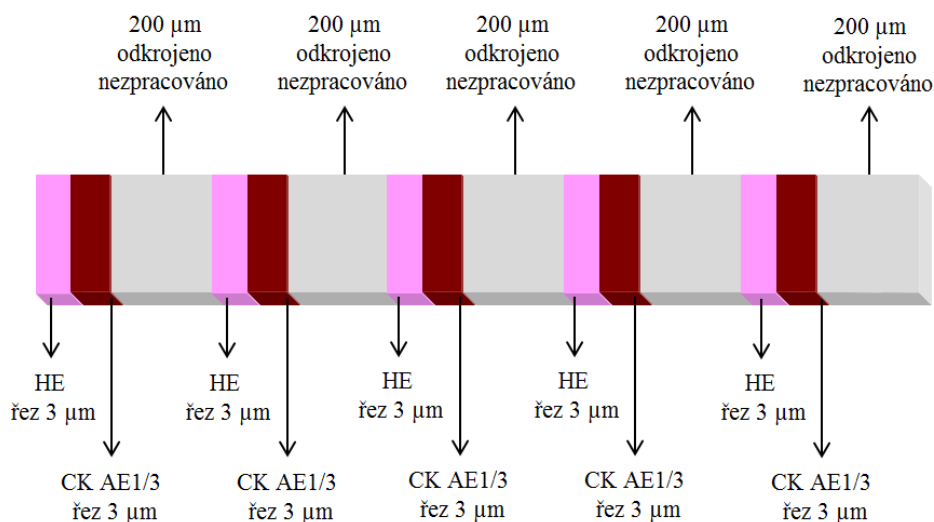
2) Následně byly všechny LU vyšetřeny protokolem určeným pro zpracovávání sentinelových LU, které byly krájeny na žiletkovém mikrotomu (Mikrotom pfm Slide 4004 M). Dle protokolu byla zhotovena dvě skla, každé se 2 až 4 řezy, podle velikosti vzorku. Řezy na prvním skle v sérii byly obarveny HE, řezy na druhém skle pak protilátkou proti cytokeratinům CK AE1/3 s hnědou koncovkou (AE1/3 Cytokeratin, Monoklonal Mouse, Clones AE1/AE3; ředění 100x; DAKO; Santa Clara, CA, USA). Tato protilátka značí epiteliální struktury AC i SCC a je využita k přesnější detekci metastáz, mikrometastáz i izolovaných nádorových buněk. V dalším kroku bylo 200 μ m LU odkrojeno a proces barvení HE a IHC byl opakován. Tento proces se opakoval až do kompletního vykrájení LU. Detailní schematické znázornění zpracování LU je na obrázku 8.

Všechny LU byly hodnoceny nezávisle dvěma patology a eventuální diskrepance byly posouzeny dalším patologem a samotný závěr představuje konsenzus všech tří patologů u tzv. vícehlavého mikroskopu (multi-head microscope).

Tato část zpracování LU byla provedena na Pracovišti klinické a transplantační patologie v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Definice – metastázy, mikrometastázy, izolované maligní buňky

Metastázy byly definovány jako přítomnost maligních struktur > 2 mm; mikrometastázy jako kolekce maligních buněk 0,2-2 mm a izolované nádorové buňky ≤ 0,2 mm.



Obrázek 8. Zpracování lymfatické uzliny. Detekce mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk.

Na obrázku je schéma lymfatické uzliny (zvětšeno nepřesně pro účely publikace).

Spodní část obrázku označuje řezy lymfatickou uzlinou nakrájené pro barvení hematoxylinem eosinem a pro imunohistochemickou reakci protilátkou CK AE1/3, každý o tloušťce 3 µm.

V horní části obrázku jsou odkrojené, nezpracované části lymfatické uzliny tloušťky 200 µm.

Každá lymfatická uzlina byla zpracována podle tohoto protokolu kompletně, tzn. do vykrájení.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

4.1.6 Statistická analýza

Všechna data byla analyzována pomocí průměru, mediánu, minimálních či maximálních hodnot. Srovnání účinností obou léčebných modalit bylo hodnoceno pomocí míry lokálních recidiv, LU metastáz nebo generalizací a úmrtnosti související s nádorem zjištěné v každé skupině během sledování. Bezpečnost byla hodnocena pomocí míry komplikací a pozorované úmrtnosti související s výkonem. Provedena byla Kaplan-Meierova analýza přežití.

Metastatické postižení LU či metastázu do jiného orgánu jsme také korelovali s histopatologickými (stupeň typ nádoru, hloubka invaze, TCD, invaze do krevních či lymfatických cév) a endoskopickými charakteristikami nádoru (velikost, lokalizace, charakter a počet lézí). Všechny zmíněné proměnné byly zahrnuty do modelu logistické regrese. Statistická významnost byla definována jako $p < 0,05$.

4.2 2. PROJEKT - VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMIE P53 V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU

4.2.1 Design studie

Prospektivní studie s prospektivním i retrospektivním sběrem dat. Cílem bylo 1) stanovení typu exprese p53 u benigních, dysplastických i maligních lézí jícnu; 2) význam imunohistochemického průkazu p53 v diagnostice lézí jícnu v terénu Barrettova jícnu; 3) stanovení rizika progresse léze v sekvenci nedysplastická sliznice – dysplazie – karcinom.

4.2.2 Pacienti

V letech 2014 až 2021 byl u vybraných pacientů s viditelnou lézí jícnu, kteří podstoupili endoskopii horního GIT vysoko rozlišovací endoskopií s NBI na Klinice hepatogastroenterologie v IKEM, proveden odběr bioptických vzorků, které byly následně zpracovány standardním způsobem pro histopatologického vyšetření s doplňujícím imunohistochemickým průkazem p53 na Pracovišti klinické a transplantační patologie. Do studie byli zařazeni pacienti, u kterých byla na úrovni HE nezávisle dvěma patology jednoznačně potvrzena diagnóza zcela benigní (= bez dysplázie), LGD, HGD či adenokarcinomu. Vyřazovací kritéria byla stanovena takto: nejednoznačná shoda v diagnóze mezi dvěma patology; známá diagnóza z předchozích biopsií; nedostatečná velikost léze definována nepřítomností stejných struktur v průkazu p53 jako v barvení HE (léze se “vykrájela”).

4.2.3 Biopsie

Biopsie byly odebrány použitím large-capacity kleští (Radial JawTM 4; Boston Scientific; Natick, MA, USA). Počet biopsií byl odebrán s ohledem na velikost vzorku, nicméně minimálně 2 biopsie byly odebrány z každé léze. Vzorky tkání byly fixovány 10% formolem.

4.2.4 Histopatologie

Veškerý materiál byl zpracován standardním způsobem doporučeným pro zpracování a vyšetření gastrointestinálních lézí. U všech lézí (benigní, dysplastické či karcinom) bylo v první linii provedeno standardní histopatologické barvení HE a Alcianovou modří s PAS reakcí, poté byl u nich proveden imunohistochemický průkaz p53 s hnědou koncovkou (Monoclonal Mouse, Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7; ředění 400x; DAKO; Santa Clara, CA, USA) za použití imunohistochemického barvicího automatu (Ventana BenchMark ULTRA; Ventana Medical Systems, Inc.; Tucson, AZ, USA). Definitivní diagnóza byla stanovena z HE (případně v kombinaci s PAS reakcí) nezávisle dvěma patology z centra specializovaného v gastrointestinální patologii a poté byla provedena, vyhodnocena a korelována imunohistochemie s definitivní diagnózou z HE.

4.2.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena použitím standardních programů MedCalc (MedCalc Software BV, Ostend, Belgie) a GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data byla hodnocena Fisherovým testem a jednotlivé hladiny významnosti byly korigovány Bonferroniho metodou v případě mnohočetných srovnání. Rovněž byly vypočteny intervaly spolehlivosti pro relativní četnosti použitím následujících vzorců (spodní hranice = $100 \cdot (p - 1,96 \cdot \sqrt{p \cdot (1-p)/n})$; horní hranice = $100 \cdot (p + 1,96 \cdot \sqrt{p \cdot (1-p)/n})$).

4.3 3. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU A ŽALUDKU

4.3.1 Design studie

Jednalo o monocentrickou, prospektivní, patologem zaslepenou studii porovnávací diagnózu stanovenou z pCLE vs. diagnózu na základě standardních biopsií; definitivní diagnóza byla pak stanovena z endoskopického nebo chirurgického resekátu. Studie byla registrována na [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pod číslem NCT02922049 (společně s projektem č. 4).

4.3.2 Pacienti

V období mezi červnem 2016 a září 2019 byli pacienti starší 18 let s viditelnou lézí jícnu a/nebo žaludku referováni na Kliniku hepatogastroenterologie do IKEM. Vylučovací kritéria byla: absence viditelné léze, alergie na fluorescein, předem známá histopatologická diagnóza, těhotenství, jícnové varixy a koagulopatie. Pacienti zařazení do studie byli vyšetřeni vysoko rozlišovací endoskopií (s NBI), poté byla u nich provedena pCLE a následoval odběr standardních biopsií. Poté pacienti podstoupili endoskopickou terapii (ER či ESD), chirurgickou terapii, onkologickou terapii nebo nebyli dále léčeni.

Studie byla schválena Etickou komisí IKEM a Fakultní Thomayerovy nemocnice (FTN). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

4.3.3 Endoskopie a pCLE

Pacienti podstoupili endoskopii horního zažívacího traktu (Endoscopy Olympus 180 nebo 190; Olympus Medical Systems, Tokio, Japonsko). Dále byly podle uvážení endoskopisty použity doplňkové metody jako např. NBI, Lugolův roztok či chromodiagnostika kyselinou octovou. V případě potřeby byl u pacientů k analgosedaci podán midazolam 2–5 mg. Všechny viditelné léze a okolní sliznice byly vyšetřeny pomocí pCLE (Cellvizio[®]; MaunaKea Technologies, Paříž, Francie), byly pořízeny videosekvence (12

snímků/sekundu) a byla použita sonda GastroFlex^{UHD} se zobrazovací hloubkou 65 µm, zorným polem 240 µm a bočním rozlišením 1 µm. Dvě až tři minuty před pCLE vyšetřením bylo intravenózně pacientovi aplikováno 2,5–5 ml kontrastní látky, fluorescein (Fluorescite 100 mg/mL injected solution; Alcon Pharmaceuticals, Praha, Česká republika). Všechny pCLE sekvence byly hodnoceny off-line zaslepeným gastrointestinálním patologem. Patolog podstoupil trénink v hodnocení pCLE během stáže na specializovaném pracovišti a on-line tréninkovém portálu. K hodnocení všech lézí byly použity validované Miami a Mainz klasifikace. Miami klasifikace byla vyvinuta speciálně pro pCLE k odlišení normálních a patologických stavů v gastrointestinální problematice a je obecně přijímanou klasifikací v diagnostice lézí pomocí pCLE (Wallace M. et al., 2011). Mainz klasifikace byla sice původně vyvinuta pro starší systém endoscope-based CLE, její klasifikace a znaky je možné použít i pro pCLE (Kiesslich R. et al., 2004). Všechny léze byly hodnoceny jako benigní, dysplastické či maligní. U lézí patolog popisoval i specifickou diagnózu (např. adenokarcinom, spinocelulární karcinom či hyperplastický polyp). U všech pořízených záznamů byla stanovena kvalita sekvencí (1 = excelentní, 2 = uspokojivá, 3 = neuspokojivá).

4.3.4 Biopsie

Standardní biopsie byly odebrány s použitím large-capacity kleští (Radial JawTM 4; Boston Scientific; Natick, MA, USA). Počet biopsií odpovídal velikosti léze, nicméně minimálně 2 biopsie byly odebrány z každé léze. Vzorky tkání byly v plastových nádobkách zality 10% formolem a byly odeslány k histopatologickému vyšetření.

4.3.5 Histopatologie

Veškerý materiál byl vyšetřen specializovaným patologem v oblasti gastrointestinální patologie. Nejasné případy byly řešeny jako konsenzus tří specializovaných patológů.

Standardní biopsie. Materiál byl fixován v roztoku 4% formaldehydu a byl zalitý do parafinu, následně byly zhotoveny řezy pro světelnou mikroskopii o tloušťce 2–3 µm a byly obarveny HE a Alcianovou modří s PASem.

Endoskopická resekce. Vzorky získané endoskopickou resekcí byly fixovány v roztoku 4% formaldehydu, makroskopicky byla spodina a okraje nabarveny odlišnou barvou a byly nakrájeny na 2–3 mm silné řezy a zpracovány kompletně. Resekční okraje byly vyšetřeny extenzivně. Vzorky byly barveny jako standardní biopsie.

Chirurgická resekce. Resekát jícnu byl zpracován standardním způsobem, suspektní oblasti byly zpracovány kompletně.

4.3.6 Výstupy

Primárními výstupy byly celková diagnostická přesnost, senzitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota biopsií a pCLE v diagnostice malignity, dysplazie a/nebo benigní léze.

4.3.7 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena použitím standardních programů MedCalc (MedCalc Software BV, Ostend, Belgie) a GraphPad Prism v7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Ke kalkulaci výtěžnosti diagnóz stanovených pCLE a z biopsií byla použita deskriptivní statistika a rozdíly mezi těmito metodami byly testovány pomocí Fisherova exaktního testu. Spočítali jsme senzitivitu, specificitu, pozitivní a negativní prediktivní faktor s 95% intervalem spolehlivosti (Clopper-Pearsonovou metodou) pCLE a biopsií diagnostikovat nebo vyloučit maligní lézi, dysplazii či benigní lézi. Spočítali jsme rovněž diagnostickou přesnost pCLE a biopsií.

4.4 4. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE VS. BIOPSIE V DIAGNOSTICE PERZISTENTNÍ / REKURENTNÍ INTESTINÁLNÍ METAPLAZIE U PACIENTŮ PO LÉČBĚ BARRETT'S OESOPHAGUS RELATED NEOPLASIA

4.4.1 Design studie

Monocentrická, prospektivní, patologem zaslepená studie, schválená Etickou komisí IKEM a FTN v červnu 2015 a byla rovněž registrována na [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pod číslem NCT02922049 (společně s projektem/studií č. 3). Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací včetně změn přijatých v Soulu v Jižní Korei během 59. valného shromáždění WMA (World Medical Association, Světová Lékařská Asociace). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie.

4.4.2 Pacienti

Do studie byli zařazeni pacienti po ukončení úspěšné endoskopické terapie BORN. Pacienti starší 18 let podstoupili v období od dubna 2016 do dubna 2019 kontrolní endoskopii (všechny výkony byly provedeny v IKEM). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Endoskopická terapie zahrnovala endoskopické resekční metody (ER či ESD) a ablační metody (RFA), event. jejich kombinaci. Vylučovací kritéria byla neprovedení žádné kurativní léčby (tito pacienti byli odesláni k chirurgické či adjuvantní chemo-radioterapii), absence kompletní lokální remise neoplazie a/nebo BJ. Mezi další vylučovací kritéria patřila antikoagulační terapie, aktivní ezofagitida, jícnové varixy či alergie na fluorescein.

Úspěšná léčba BORN byla definována jako kompletní makroskopická i mikroskopická eradikace neoplázie (bez viditelného segmentu BJ).

4.4.3 Endoskopie a konfokální laserová endomikroskopie

Pacienti podstoupili endoskopii s vysokým rozlišením (high-definition white light endoscopy, HD-WLE) (Olympus 180 nebo 190, Olympus Medical Systems, Tokio, Japonsko). V případě potřeby byla pacientům podána analgosedace midazolamem 2-5 mg intravenózně a u pacientů bylo po kontrole HD-WLE provedeno vyšetření pCLE. Před pCLE byl intravenózně podán 10% fluorescein v dávce 2,5–5 ml (Fluorescite 100mg/ml inj sol, Alcon Pharmaceuticals, Praha, Česká republika). Několik minut po podání fluoresceinu byla pracovním kanálem endoskopu zavedena sonda CLE (GastroFlex™, MP-009-HDG, Mauna Kea Technologies, Paříž, Francie) a následně byly detailně přiblíženy všechny cílové oblasti. Videosekvence byly zaznamenány z celého obvodu neo-Z linie, z viditelných jazýčků metaplastické sliznice nebo jakýchkoli nepravidelností a z neoskvamózního epitelu jícnu (ošetřovaná oblast). Po dokončení vyšetření pCLE byly odebrány biopsie. Videosekvence a snímky byly hodnoceny zkušeným patologem vyškoleným v pCLE, který byl zaslepen s ohledem na histologické výsledky standardních biopsií. Intestinální metaplazie v pCLE byla definována přítomností kolumnárního epitelu s klkovitou kresbou obsahující minimálně jednu pohárkovou buňku, která byla definována jako pravidelná buňka s tmavou elipsoidní vakuolou s pravidelným okrajem o velikosti asi 20 mikrometrů. Dysplastická sliznice BJ byla charakterizována černými buňkami s nepravidelnými okraji a tvary, vysokým tmavým kontrastem k okolní tkáni a nepravidelnými prosakujícími kapilárami ve sliznici (tzv. Miamská klasifikace).

4.4.4 Biopsie

Po ukončení pCLE bylo u každého pacienta odebráno minimálně 4–6 biopsií z neo-Z linie a nejméně 3 biopsie nad neo-Z linií z tzv. neo-skvamózního epitelu a z každé viditelné abnormality sliznice jícnu (jazýčky a ostrůvky) pomocí tzv. velkokapacitních kleští (Radial Jaw TM4, Boston Scientific, Natick, MA, USA). Vzorek byl fixován v 10% formolu s zpracováním standardním procesem pro histopatologické hodnocení.

Definice

Definitivní diagnóza IM a/nebo neoplázie byla stanovena, pokud byl nález potvrzen pomocí obou metod (biopsií i pCLE) a nebyly žádné diskrepance.

Perzistující IM byla definována jako přítomnost IM u pacienta po úspěšné léčbě neoplazie a makroskopické eradikaci BJ. Rekurentní metaplazie byla definována jako IM zjištěná u pacienta s dříve potvrzenou kompletní remisi intestinální metaplazie v alespoň 2 po sobě následujících endoskopiích.

4.4.5 Hlavní cíle

V této studii jsme si stanovili tyto cíle:

1. Porovnat pCLE a biopsie v diagnostice perzistující/recidivující IM a recidivující neoplazie u pacientů po endoskopické léčbě BORN.
2. Posoudit senzitivitu, specificitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu pCLE při detekci perzistentní/rekurentní IM a neoplazie s ohledem na definitivní diagnózu IM nebo neoplazie před léčbou pacientů.
3. Určit počet žlázek a pohárkových buněk detekovaných pomocí pCLE a standardních biopsií, jelikož pCLE teoreticky disponuje výhodou vyšetření větší oblasti sliznice jícnu v porovnání s odběrem biopsií.

4.4.6 Statistická analýza

Prezentována data jsou počty a procenta, průměry se standardními odchylkami a mediány s rozsahem. Senzitivita, specificita, prediktivní hodnoty s 95% intervalem spolehlivosti k potvrzení nebo vyloučení diagnózy IM a neoplazie pomocí obou metod. Pro výpočet intervalu spolehlivosti byla použita Clopper-Pearsonova metoda. Rozdíly v proporcích skutečných negativ (specifičnost) a pozitiv (senzitivita) a skutečných diagnóz (diagnostická přesnost) byly testovány použitím McNemarsova testu. Celková shoda mezi biopsiemi a pCLE při diagnostice IM byla hodnocena pomocí Cohenova koeficientu kappa. Vzhledem k tomu, že diagnóza recidivující neoplazie se vyskytla pouze jednou, nebylo možné tyto parametry vypočítat. Průměrný počet žláz a pohárkových buněk hodnocených pomocí obou metod byl porovnán použitím Studentova *t*-testu, přičemž hodnota $<0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Minimální plánovaný počet pacientů zahrnutých do studie byl 50 (křížený design, očekávaná diagnostická přesnost biopsií 80 %, 95% CI: 65–90, $p = 0,05$; 80% síla studie).

5 VÝSLEDKY

5.1 1. PROJEKT

5.1.1 Charakteristika pacientů

V období od ledna 2004 do března 2019 podstoupilo endoskopickou resekci či endoskopickou submukózní disekci na našem pracovišti celkově 191 pacientů, z toho 65 jich splnilo kritéria k zařazení do naší studie. Celkem 48 (74 %) pacientů mělo diagnostikovaný časný „high-risk“ AC a 17 (26 %) pacientů mělo diagnostikovaný časný SCC.

Sedmnáct pacientů mělo T1a karcinom s jedním nebo více rizikovými faktory a 48 pacientů mělo T1b karcinom. Detailní přehled výskytu jednotlivých rizikových faktorů v našem souboru je znázorněn v tabulce 3. Charakteristika pacientů a demografické faktory jsou v tabulce 4.

Tabulka 3. Přehled histologických rizikových faktorů vztažených k jednotlivým typům nádoru.

Typ tumoru	Invaze tumoru	G3-4	A+	L+	TCD3
AC (n = 48)	T1a (n = 14)	11	1	5	6
	T1b – sm1 (n = 15)	6	1	2	3
	T1b – sm2 (n = 4)	3	2	3	2
	T1b – sm3 (n = 15)	13	5	9	5
SCC (n = 17)	T1a (n = 3)	2	0	1	1
	T1b – sm1 (n = 1)	1	0	0	0
	T1b – sm2 (n = 6)	2	1	3	1
	T1b – sm3 (n = 7)	5	3	4	1
Σ (n = 65)		43/65 (66,2 %)	13/65 (20 %)	27/65 (41,5 %)	19/65 (29,2 %)

Čísla charakterizují výskyt/počet daného rizikového faktoru vztaženého ke konkrétní hloubce invaze u adenokarcinomu i spinocelulárního karcinomu. Procenta jsou součtem jednoho rizikového faktoru.

Zkratky: A+ - angioinvaze; AC – adenokarcinom; G – grading; L; - lymfangioinvaze; SCC – spinocelulární karcinom; sm – submukózní invaze; TCD – tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk

Tabulka 4. Charakteristika pacientů a demografické faktory.

Faktor	AC (n = 48)	SCC (n = 17)	Σ (n = 65)
Pohlaví			
Mužské	43 (89,6 %)	12 (70,6 %)	55 (84,6 %)
Ženské	5 (10,4 %)	5 (29,4 %)	10 (15,4 %)
Medián věku (rozmezí)	64,7 (35-87)	61,6 (35-77)	63,8 (35-87)
Počet lézí a velikost			
1 ložisko < 2 cm	25 (52,1 %)	5 (29,4 %)	30 (46,2 %)
1 ložisko ≥ 2 cm	13 (27,1 %)	9 (52,9 %)	22 (33,9 %)
2 ložiska	6 (12,5 %)	1 (5,9 %)	7 (10,8 %)
Více ložisek (multifokální)	4 (8,3 %)	2 (11,8 %)	6 (9,2 %)
Lokalizace tumoru			
Proximální jícen	-	7 (41,2 %)	7 (10,8 %)
Střední jícen	1 (2,1 %)	5 (29,4 %)	6 (9,2 %)
Distální jícen	47 (97,9 %)	5 (29,4 %)	52 (80 %)

Zkratky: AC – adenokarcinom; SCC – spinocelulární karcinom

5.1.2 Výsledky chirurgické terapie a histopatologické hodnocení

Celkem 30/65 (46 %) pacientů podstoupilo ezofagektomii s lymfadenektomií. Medián doby od endoskopické resekce do ezofagektomie byl 2 měsíce (rozsah 0–9). Delší interval byl v několika případech způsoben potřebou zlepšit klinický či nutriční stav pacientů před náročným operačním výkonem. Žádnému pacientovi nebyla před operací podána neoadjuvantní terapie.

Komplikace spojené s operací byly pozorovány u 43,3 % (13/30) operovaných pacientů. Tzv. 30denní mortalita související s výkonem představovala 6,7 % (2/30). Jeden z těchto pacientů trpěl syndromem septické zánětlivé odpovědi (SIRS) a druhý pacient zemřel po dehiscenci anastomózy. U dalšího pacienta byl

problémem leak v anastomóze, pro který byl několikrát reoperován a zemřel 2 roky po výkonu na komplikace dalších operací. Jeden z pacientů byl reoperován několik dní po ezofagektomii pro chylothorax způsobený iatrogenním poraněním ductus thoracicus. Nejčastější pozdní komplikací po ezofagektomii byla postchirurgická gastroparéza, která se vyskytla u 5 pacientů (16,5 %). Stenóza reziduálního jícnu se vyvinula u dvou pacientů (6,7 %). Dva pacienti byli později odesláni na plastickou chirurgii kvůli rozvoji kýly v jizvě.

Histopatologické vyšetření vzorků z chirurgického resektátu jícnu odhalilo lokální rezidua malignity u 33,3 % (10/30) operovaných pacientů, z toho v pěti případech byla invaze tumoru hlubší než invaze popsána v endoskopickém resektátu. HGD byla popsána u 20 % (6/30) pacientů a LGD u 3,3 % (1/30). Ve 43,3 % (13/30) vzorků nebyla zastižena ložiska karcinomu ani dysplazie, tudíž předchozí endoskopickou resekcí/disekcí lze považovat za radikální.

Celkem bylo resekováno, kompletně zpracováno a vyhodnoceno 622 lymfatických uzlin (LU; obecně platný protokol na vyšetřování sentinelových LU pro jiné orgány). Průměrně bylo vyšetřeno 21 LU/1 pacienta (rozmezí 2–42 LU). Dva pacienti měli metastázy na úrovni světelné mikroskopie ve 2/10 LU, respektive v 16/42 LU.

Po podrobné analýze mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk byli identifikováni další 4 pacienti s pozitivními LU (obrázek 8). Histopatologické charakteristiky těchto pacientů jsou uvedeny v tabulce 6.

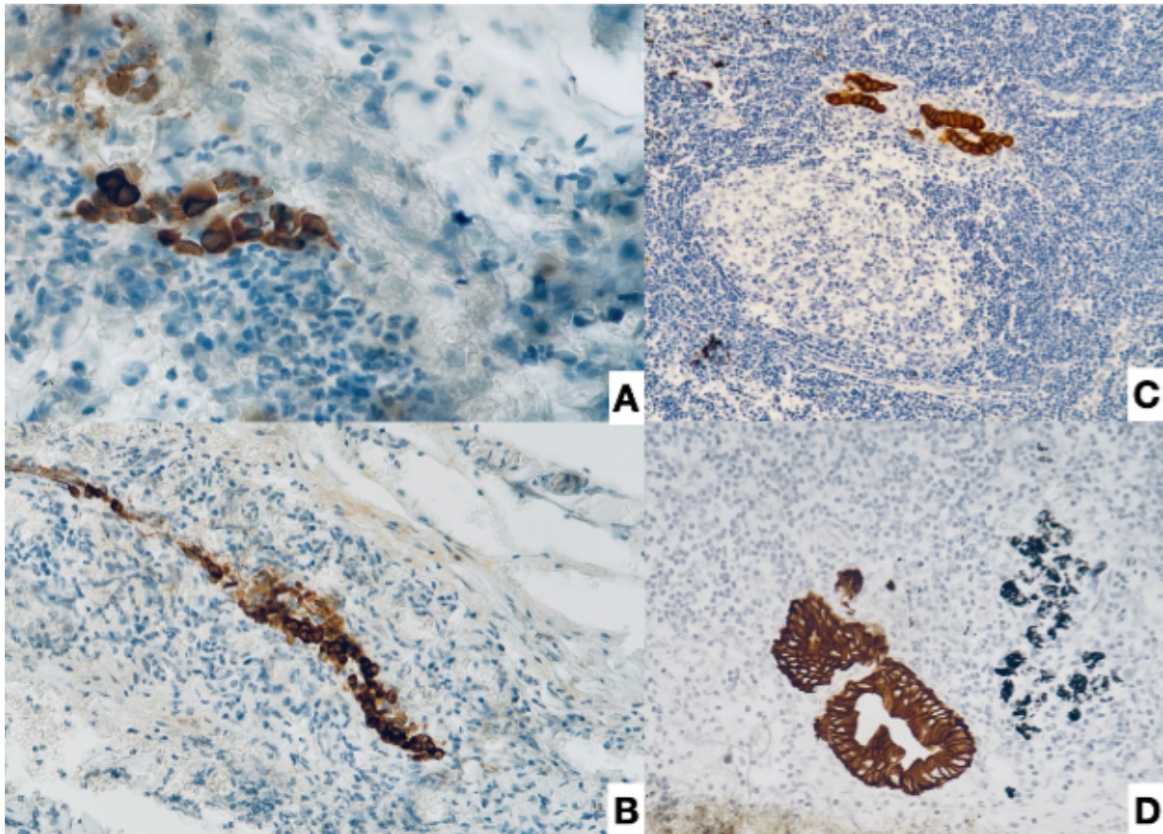
Tabulka 6. Histopatologické charakteristiky pacientů s metastázami, mikrometastázami a izolovanými nádorovými buňkami.

	Pacient č.	Věk	Pohlaví	Histopatologické charakteristiky
Metastázy	1.	74	muž	AC, sm3, G3, TCD3, A+, L+
	2.	70	muž	AC, sm1, G3, TCD3, A-, L-
Mikrometastázy Izolované nádorové buňky	3.	66	žena	AC, sm3, G3, TCD2, A+, L+
	4.	63	žena	AC, sm1, G3, TCD2, A-, L+
	5.	68	muž	AC, m4, G1, TCD1, A-, L+
	6.	62	žena	SCC, sm2, G2, TCD1, A-, L-

Zkratky: A+ - angioinvaze; AC – adenokarcinom; G – grading; L; - lymfangioinvaze; SCC – spinocelulární karcinom; sm – submukózní invaze; TCD – tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk

Pacient č. 5 byl jediným pacientem v našem souboru s tumorem T1a (slizniční invaze) a možným postižením LN. V resekátu jícnu však bylo nalezeno reziduum nádoru s hlubší invazí, než bylo hodnoceno v endoskopickém resekátu.

Medián sledování v této skupině byl 24 měsíců (1–85). Mortalita související s nádorem činila 3,3 % (1/30) – tento pacient zemřel v důsledku generalizace nádoru odhalené po výkonu. Celková mortalita chirurgické léčby představovala 11 % (4/30) a zahrnovala 1 generalizaci, 2 procedure-related úmrtí a 1 pozdní komplikaci (komplikace dalších nutných operací).

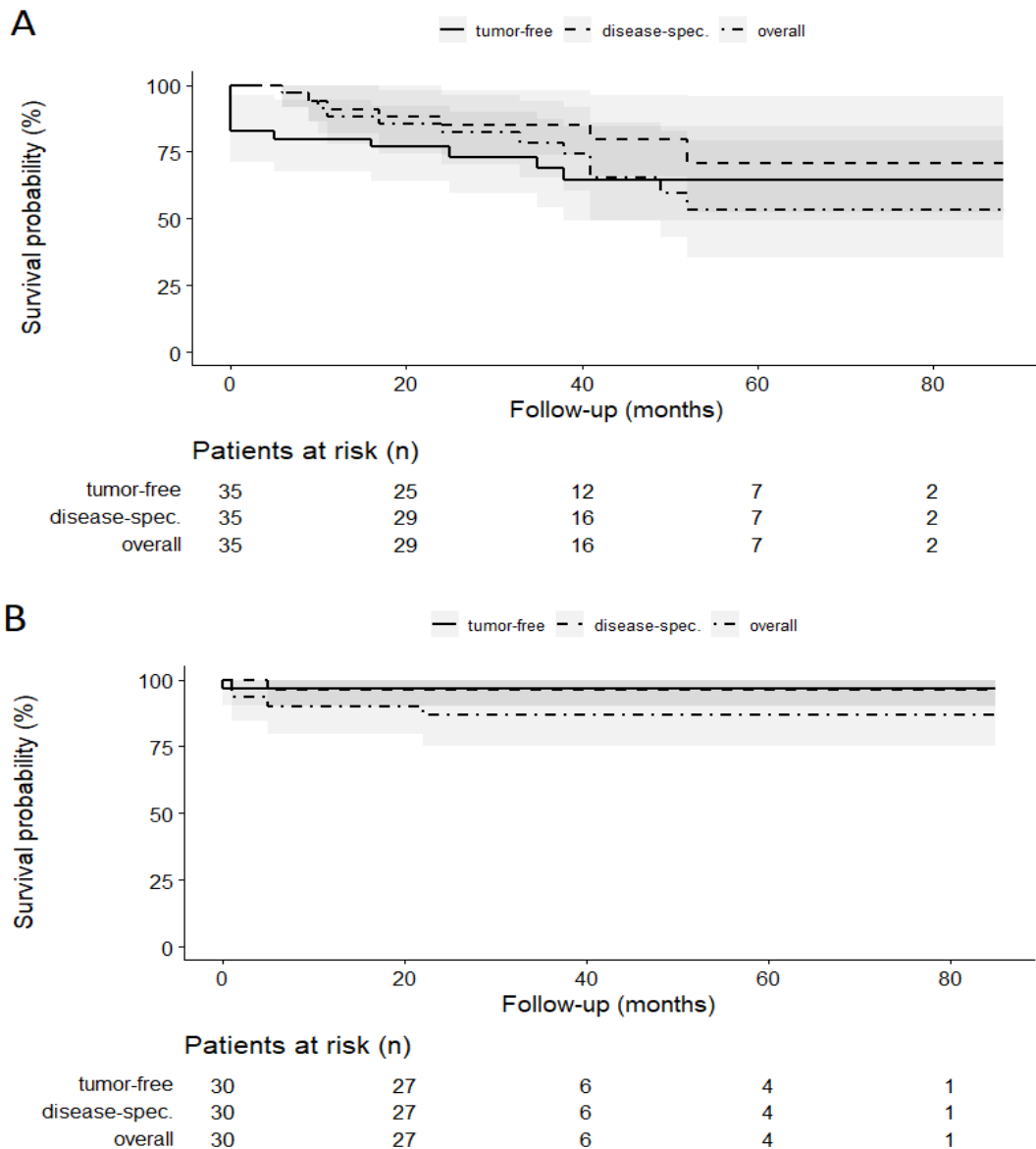


Obrázek 9. Pozitivní lymfatické uzliny vyšetřené imunohistochemicky protilátkou CK AE1/3 – hnědá barva představuje pozitivní záchyt.

A. Pozitivita izolovaných nádorových buněk. B-D. Pozitivita mikrometastáz.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Pětileté přežití specifické pro onemocnění (disease-specific survival) v této skupině činilo 96,4 % (95 % CI 89,8–100). Celkové pětileté přežití dosáhlo 86,7 % (95 % CI 75,3–99,7). Kaplan-Meierovy křivky přežití pro chirurgicky i endoskopicky léčené pacienty lze nalézt na obrázku č. 10.



Obrázek 10. Kaplan-Meierova křivka přežití.

Křivka porovnává přežití pacientů léčených endoskopicky (nahore) a chirurgicky (dole) s ohledem na pravděpodobnost přežití a ukazuje delší přežití pacientů v chirurgické skupině. Tento rozdíl je dán i faktem, že všichni pacienti nebyli referováni k ezofagektomii (komorbidita, odmítavý postoj).

5.1.3 Výsledky endoskopické léčby

U 35 pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu (35/60) byla operace kontraindikována nebo radikální chirurgický výkon pacienti odmítli. Celkem 12 z 35 pacientů (34 %) léčených endoskopicky zemřelo během sledování. Mortalita související s nádorem byla pozorována u 7 z nich (20 %) a byla přímo spojena s progresí základního onemocnění. Příčinami dalších úmrtí, která nesouvisela se základním (sledovaným) onemocněním, byly chronická obstrukční plicní nemoc (2/35; 5,7 %), non-Hodgkinův lymfom (1/35; 2,9 %), primární karcinom plic (1/35; 2,9 %) a kardiogenní šok způsobený akutním infarktem myokardu (1/35; 2,9 %).

Ve srovnání s chirurgickou terapií nesouviselo žádné z úmrtí pacientů s endoskopickým výkonem. Téměř u poloviny pacientů došlo k mírnému periprocedurálnímu krvácení, u každého z nich však bylo pomocí dostupných endoskopických metod úspěšně dosaženo hemostázy. U jednoho z pacientů se krvácení objevilo znovu několik hodin po výkonu a bylo nutné opakovaně provádět endoskopickou hemostázu. U jiného pacienta došlo při provádění cirkulární ESD k drobné perforaci, která byla ošetřena klipem a výkon proběhl bez dalších pozoruhodností. Během sezení RFA ani APC nebyly pozorovány žádné komplikace.

Počet post-procedurálních komplikací byl u pacientů léčených pouze endoskopickými modalitami relativně nízký. Rozvoj stenózy jícnu jsme zaznamenali u dvou pacientů. Jedna z nich vznikla po provedení cirkulární ESD s drobnou perforací, druhá se rozvinula po třech po sobě následujících endoskopických slizničních resekcích. Stenózy byly řešeny balónkovou a bužiovou dilatací.

Medián sledování byl 38,5 měsíce (4–88). U 28/35 (80 %) pacientů bylo dosaženo kompletní endoskopické remise. K dosažení CER bylo potřeba průměrně 2,2 sezení (1–7) endoskopické léčby. U 14 (50 %) z těchto pacientů byla RFA použita k eradikaci reziduální dysplastické nebo metaplastické sliznice. Čtyři pacienti (14,3 %) podstoupili adjuvantní onkologickou léčbu. U dvou z pacientů s CER byla později diagnostikována lokální recidiva následovaná generalizací onemocnění. U dalších 3 pacientů byla generalizace diagnostikována několik měsíců po dosažení CER. Průměrná doba do recidivy/generalizace byla 23,5 měsíce (5–38).

Několik pacientů, kteří nedosáhli CER (7/35; 20 %), pokračovalo v paliativní léčbě – především s APC (2/7; 28,6 %), nebo byli léčeni onkologicky (3/7; 42,9 %). K metastatickému rozsevu došlo v průběhu sledování u 4/7 (57,1 %) těchto pacientů.

Odhadovaná míra 5letého přežití v endoskopické skupině byla 53,1 % (95 % CI: 35,6–79,3), nicméně přežití specifické pro onemocnění bylo 70,8 % (95 % CI: 52,5–95,6). Podrobné srovnání výsledků hodnocených u endoskopické a chirurgické skupiny je v tabulce 7.

Tabulka 7. Srovnání dlouhodobých výsledků endoskopické a chirurgické terapie.

	Endoskopie (n = 35)	Ezofagektomie (n = 30)
Medián sledování (měsíce)	38,5 (4–88)	24 (1–85)
Celková úmrtnost (všechny příčiny)	12 (34,3 %)	4 (13,3 %)
Tumor-related mortality	7 (20 %)	1 (3,3 %)
Procedure-related mortality	0 (0 %)	2 (6,7 %)
Post-procedurální komplikace	3 (8,6 %)	13 (43,3 %)
Dlouhodobá remise	22 (62,9 %)	26 (86,7 %)
5leté celkové přežití	53,1 % (95% CI 35,6–79,3)	86,7 % (95% CI 75,3–99,7)
5leté přežití specifické pro nemoc	70,8 % (95% CI, 52,5–95,6)	96,4 % (95% CI 89,8–100)

Zkratky: CI – confidence interval, interval spolehlivosti

5.1.4 Celkové hodnocení endoskopické a chirurgické léčby – metastázy do lymfatických uzlin, vzdálené metastázy, generalizace

U pacientů s AC došlo ke generalizaci nebo postižení LU v 18,6 % (9/48) případů, zatímco v případě SCC byla generalizace či postižení uzlin v 35,3 % (6/17) případů; $p = 0,171$. Disociace nádorových buněk a grading nádoru nesouvisely s agresivitou nádoru (TCD3: $p = 0,292$; G3-4: $p = 0,991$), stejně jako endoskopické charakteristiky použité v této studii – ložisko nádoru ($p = 0,65$), jeho lokalizaci a velikost ($p = 0,568$). Naopak, invaze do krevních či lymfatických cév vykazovaly statistickou významnost z hlediska možné souvislosti s výskytem generalizace onemocnění (A+: $p = 0,034$; L+: $p = 0,007$).

U jednoho pacienta s T1a invazí u AC došlo k postižení LU zjištěného při analýze mikrometastáz. U dalších 16 pacientů s T1a karcinomem nebyla nalezena generalizace ani postižení LU. Mezi 16 pacienty s invazí sm1 (15x AC, 1x SCC) došlo u 4 pacientů (25 %, všichni s přítomnými dalšími rizikovými faktory) ke generalizaci/postižení LU. Další postižení LU/vzdálené metastázy byly pozorovány u pacientů s touto charakteristikou: 2/10 (20 %) u sm2 invaze (oba SCC), 4/15 (26,7 %) u sm3 AC a 4/7 (57,1 %) u sm3 SCC.

Kompletní shrnutí generalizace a postižení LU s ohledem na histopatologické charakteristiky je v tabulkách 8 a 9.

Tabulka 8. Kompletní přehled generalizace a postižení lymfatických uzlin s ohledem na histopatologické charakteristiky.

	Generalizace / postižení LU (včetně mikrometastáz a INB)		Σ	p hodnota hodnota
	AC	SCC		
Typ tumoru (typing)	18,6 % (9/48)	35,3 % (6/17)	23,1 % (15/65)	0,17
Invaze do lymfatických cév				0,007
Negativní (L-)	6,9 % (2/29)	22,2 % (2/9)	10,5 % (4/38)	
Pozitivní (L+)	36,8 % (7/19)	50 % (4/8)	40,7 % (11/27)	
Invaze to krevních cév				0,03
Negativní (A-)	12,8 % (5/39)	30,8 % (4/13)	17,3 % (9/52)	
Pozitivní (A+)	44,4 % (4/9)	50 % (2/4)	46,2 % (6/13)	
Diferenciace tumoru				0,99
Dobrá/střední (G1-2)	6,7 % (1/15)	14,3 % (1/7)	9,1 % (2/22)	
Nízká	24,2 % (8/33)	50 % (5/10)	30,2 % (13/43)	
TCD				0,29
TCD 0-2	12,5 % (4/32)	35,7 % (5/14)	19,6 % (9/46)	
TCD 3	31,3 % (5/16)	33,3 % (1/3)	31,6 % (6/19)	
pT tumoru				0,08
T1a	7,1 % (1/14)	0 % (0/3)	5,9 % (1/17)	
T1b	23,5 % (8/34)	42,9 % (6/14)	29,2 % (14/48)	
sm1 bez RF	0 % (0/9)	-	0 % (0/9)	
sm1 s RF	66,7 % (4/6)	0 % (0/1)	57,1 % (4/7)	
sm2	0 % (0/4)	33,3 % (2/6)	20 % (2/10)	
sm3	26,7 % (4/15)	57,1 % (4/7)	36,4 % (8/22)	

Zkratky: A+ - angioinvaze; AC – adenokarcinom; G – grading; INB – izolované nádorové buňky; L+ - lymfangioinvaze; RF – rizikový faktor; SCC – spinocelulární karcinom; sm – submukózní invaze; TCD – tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk

Tabulka 9. Kompletní přehled generalizace a postižení lymfatických uzlin s ohledem na endoskopické charakteristiky.

	Generalizace / postižení LU (včetně mikrometastáz a INB)		Σ	p hodnota hodnota
	AC	SCC		
Velikost a charakter léze				0,65
1 ložisko < 2 cm	16 % (4/25)	40 % (2/5)	20 % (6/30)	
1 ložisko ≥ 2 cm	23 % (3/13)	44,4 % (4/9)	31,8 % (7/22)	
2 ložiska	16,7 % (1/6)	0 % (0/1)	14,3 % (1/7)	
Více ložisek (multifokální)	25 % (1/4)	0 % (0/2)	16,7 % (1/6)	
Lokalizace v jícnu				0,57
proximální jícen		28,6 % (2/7)	28,6 % (2/7)	
střední jícen	0 % (0/1)	60 % (3/5)	50 % (3/6)	
distální jícen	19,2 % (9/47)	20 % (1/5)	19,2 % (10/52)	

Zkratky: AC – adenokarcinom; INB – izolované nádorové buňky; SCC – spinocelulární karcinom

5.2 2. PROJEKT

5.2.1 Charakteristika pacientů a lézí

Celkem 126 pacientů podstoupilo endoskopii horního zažívacího traktu a následně bylo do studie zařazeno 87 pacientů s lézí jícnu. Ze studie bylo vyřazeno celkem 49 pacientů z důvodu nejednoznačné shody v definitivní diagnóze mezi hodnotícími patology a/nebo z důvodu nedostatečné velikosti léze na mikroskopické úrovni, čímž se léze v imunohistochemickém průkazu vykrájela. Věkový medián pacientů byl 64 let (rozmezí 31–89 let), muži byli postiženi v 65,5 % (57/87) případech. Vyšetřili jsme 87 lézí jícnu (u každého pacienta byla vyšetřena 1 suspektní léze). Definitivní diagnóza byla stanovena histopatologicky z hematoxylin eosinu s následnou korelací s imunohistochemickým průkazem p53.

5.2.2 Definitivní diagnózy stanovené histopatologicky z hematoxylin eosinu

Celkově bylo vyšetřeno 87 lézí (57 mužů, 30 žen), z toho 43 (49 %) s benigní lézí či BJ (25 mužů, 18 žen), 12 (14 %) s low-grade dysplazií (8 mužů, 4 ženy), 14 (16 %) s high-grade dysplazií (9 mužů, 5 žen) a 18 (21 %) s adenokarcinomem jícnu (15 mužů, 3 ženy). Přehled lézí je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10. Charakteristika lézí diagnostikovaných histopatologicky barvením hematoxylin eosin.

	Benigní léze a BJ	LGD	HGD	AC	Celkem
Muži	25	8	9	15	57
Ženy	18	4	5	3	30
Celkem	43 (49 %)	12 (14 %)	14 (16 %)	18 (21 %)	87 (100 %)

Zkratky: AC – adenokarcinom; BJ – Barrettův jícen; HGD – high-grade dysplazie; LGD – low-grade dysplazie

5.2.3 Výsledky imunohistochemického průkazu p53

U 43 benigních lézí bez dysplazie a BJ byl průkaz p53 u většiny z nich normální, tj. byla prokázána tzv. wild-type exprese v IHC u 40 lézí, (93 %; 40/43). Abnormální/mutovaný obraz byl zastižen u tří lézí (3/43; 7 %), z toho u 1 léze bylo p53 IHC pozitivní a dvě léze byly negativní. U těchto tří pacientů byly léze hodnoceny na základě nálezu v HE jako léze bez dysplázie.

U 12 lézí s LGD mělo 6 (50 %) wild-type obraz a 6 (50 %) lézí bylo p53 fokálně pozitivní (slaběji ve srovnání s HGD). Žádná léze nebyla negativní.

U 14 lézí s HGD měla 1 (7 %) wild-type obraz a 14 (93 %) lézí mělo mutovaný obraz, všechny byly difúzně blokově silně pozitivní. Žádná léze nebyla negativní.

Adenokarcinom: celkem bylo vyšetřeno 18 AC, všechny měly abnormální obraz, z toho 9 (50 %) bylo negativních a dalších 9 (50 %) bylo pozitivních (2 byly pozitivní ve většině léze a 7 bylo difúzně pozitivních). U žádného AC nebyl nalezen wild-type obraz.

Detailní histopatologický rozbor je uveden v tabulce 11. Ukázky typických příkladů normálního a abnormálního (pozitivního) obrazu jednotlivých lézí jsou shrnuty na obrázku 11.

Tabulka 11. Nálezů imunohistochemie p53 u jednotlivých lézí.

	Normální exprese	Abnormální exprese		Celkem
	Wild-type	Pozitivní	Negativní	
Benigní léze a BJ	40 (85 %)	1 (2,5 %)	2 (5 %)	43
		3 (7,5 %)		
LGD	6 (13 %)	6 (15 %)	0 (0 %)	12
		6 (15 %)		
HGD	1 (2 %)	13 (32,5 %)	0 (0 %)	14
		13 (32,5 %)		
AC	0 (0 %)	9 (22,5 %)	9 (22,5 %)	18
		18 (45 %)		
Celkem	47 (100 %)	29 (72,5 %)	11 (27,5 %)	87
		40 (100 %)		

Procenta jsou vztažena k jednomu typu exprese u všech lézí, t.z. vyjadřují procentuální zastoupení jednotlivých diagnóz k danému typu exprese, jelikož léze byly mezi sebou statisticky srovnávány právě v daném typu exprese (např. benigní léze a BJ vs. LGD u wild-type obrazu).

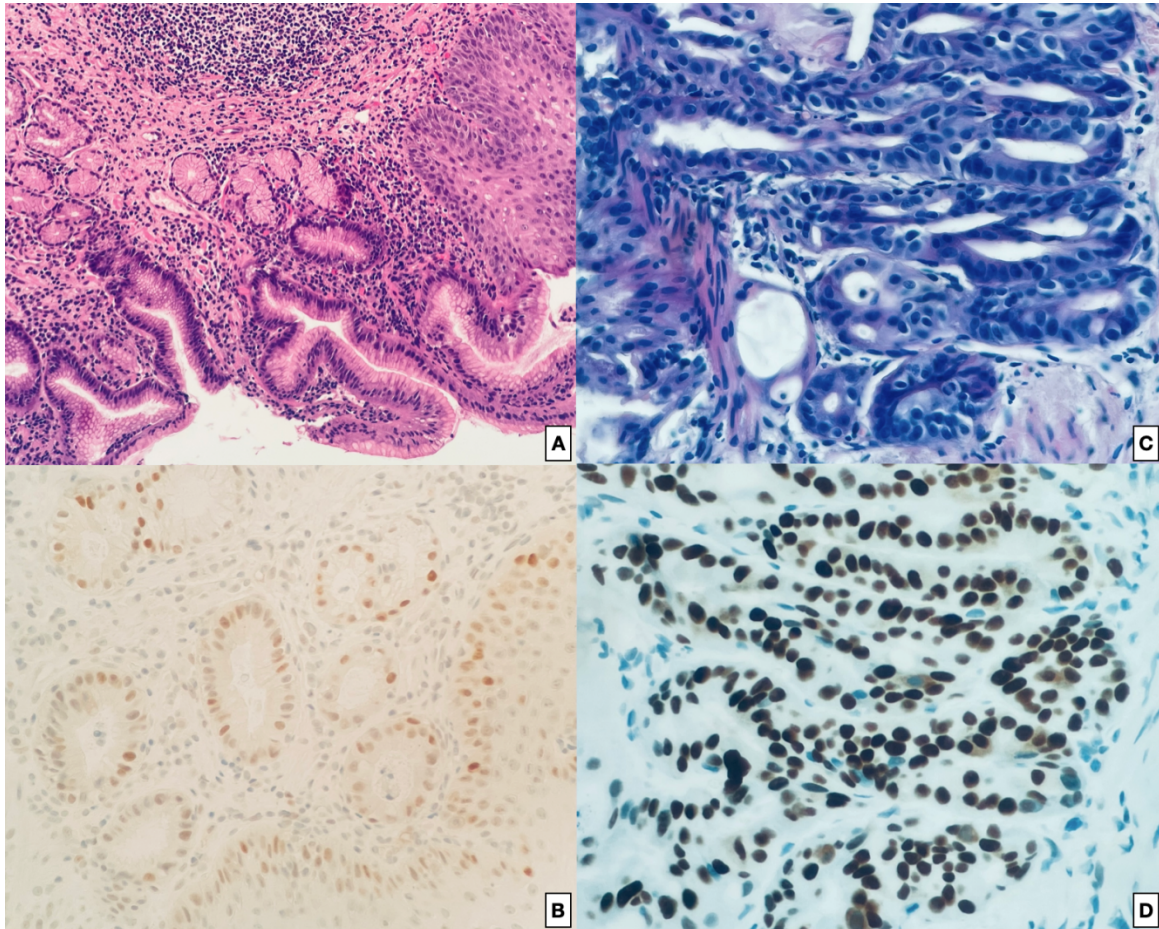
Zkratky: AC – adenokarcinom; BJ – Barrettův jícen; HGD – high-grade dysplazie; LGD – low-grade dysplazie

5.2.4 Korelace imunohistochemického průkazu p53 s definitivní diagnózou z hematoxylin eosinu

Normální/nemutovaný, tzv. wild-type obraz IHC průkazu p53 byl přítomen celkově u 47 lézí (40x BJ, 6x LGD, 1x HGD, žádná u AC). Abnormální/mutovaný, pozitivní exprese byla u 28 lézí (1x BJ, 6x LGD, 13x HGD a 9x AC), negativní u 11 lézí (2x BJ, 9x AC). Dysplastické léze vykazovaly diagnostický mutovaný obraz v 73 % případů. Přítomnost normálního nemutovaného, wild-type obrazu se liší mezi jednotlivými lézemi, $p < 0,0001$. Výsledky korelace IHC průkazu p53 s definitivní diagnózou stanovenou z HE nám ukazují, že průkaz p53 nám může pomoci v odlišení benigních lézí (zánětlivých, regenerativních atypií a jiných) od dysplastických změn, včetně LGD. Benigní léze bez dysplazie se lišily od LGD ($p = 0,0114$), od HGD ($p < 0,0001$) i od AC ($p < 0,0001$). Intenzita průkazu p53 byla vyšší v případě HGD stejně jako u LGD, statistická významnost pro rozdíl mezi LGD a HGD nebyla prokázána. Testovali jsme také odlišnost HGD od AC,

kde rozdíl rovněž nebyl nalezen, což ovšem není zásadní neboť v rutinní histopatologické praxi právě odlišení těchto dvou lézí obvykle nečiní problémy a pak oba typy lézí jsou indikovány k endoskopické terapii. Normální/nemutovaný, wild-type fenotyp mají následovné intervaly spolehlivosti: BJ a nedysplastické léze (95% CI 85–100 %), LGD (95% CI 21–79 %), HGD (95% CI 0–21 %) a AC (95% CI 0–17 %). U lézí BJ, HGD i AC procento abnormálního/mutovaného obrazu nekoreluje s rozmezím intervalem spolehlivosti nemutovaného obrazu, tudíž můžeme říci, že u těchto lézí se liší abnormální od normálního wild-type obrazu.

Typ léze se mezi pohlavím v našem souboru neliší ($p = 0,3052$).



Obrázek 11. Korelace nálezu hematoxylin eosinu a imunohistochemického průkazu p53.

Levá polovina: A. Hematoxylin eosin; Dlaždicový epitel a epitel typu žaludeční kardia bez dysplazie. B. Imunohistochemický průkaz p53, wild-type obraz.

Pravá polovina: C. Hematoxylin eosin; High-grade dysplazie epitelu v terénu intestinální metaplasie (není na fotografii zastižena). D. Imunohistochemický průkaz p53 s difúzní blokovou pozitivitou.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

5.3 3. PROJEKT

5.3.1 Charakteristika pacientů a výkon

Celkově bylo do studie zařazeno 67 pacientů, medián 65,4 let (rozmezí 35–84 let), s převahou mužů 77,6 % (52/67). Vyšetřili jsme 74 lézí (53 lézí jícnu a 21 lézí žaludku). Definitivní diagnóza byla stanovena z endoskopického resektátu v 70,3 % případů (52/74 lézí) a z biopsie na základě konsenzu více specializovaných patologů v 28,4 % případů (21/74 lézí). U jednoho pacienta (1,3 %) byla definitivní diagnóza stanovena na základě pCLE (pacient s pokročilým SCC, přičemž ve standardní biopsii byla zachycena pouze nekrotická tkáň).

Definitivní nálezy pacientů jsou shrnuty v tabulce 12. Mezi benigní léze patřily zánětlivé, hyperplastické a fundic gland polypy, gastrická intestinální metaplázie, cylindrická a apokrinní metaplázie a tumor z granulárních buněk (v naší studii byl nejspíše poprvé v literatuře tumor z granulárních buněk zcela korelován v pCLE s histopatologickým obrazem, obrázek 14).

Tabulka 12. Charakteristika lézí vyšetřovaných pCLE.

	Jícen	Žaludek
Benigní léze	17	11
Dysplastické léze	7	5
Maligní léze	29	5
Adenokarcinom	20	5
Spinocelulární karcinom	9	0
Celkový počet lézí	53	21

5.3.2 Diagnostická přesnost

pCLE diagnóza byla správná v 89,2 % (66/74) a nesprávná v 10,8 % případů (8/74), zatímco diagnóza stanovená na základě klešťové biopsie byla správná v 85 % (57/67) a nesprávná v 15 % případů (10/67); $p = 0,6$. Detailní analýza neshod mezi biopsiemi a pCLE je znázorněna v tabulce 14. pCLE potvrdila maligní diagnózu v 88,2 % (30/34), zatímco biopsie ji potvrdily v 75,9 % případů (22/29); $p = 0,3$. Dysplastické léze byly správně diagnostikovány pomocí pCLE v 83 % (10/12) a v biopsiích ve 100 % případů (10/10); $p = 0,48$.

Diagnóza benigních lézí byla správná v 92,8 % (26/28), zatímco v biopsiích v 89,2 % případů (25/28); $p = 1$. pCLE umožnila stanovit “správnou” specifickou histopatologickou diagnózu v 90,9 % případů (60/66).

Celková diagnostická přesnost biopsií byla 85 % (95% CI 76–94 %) a pCLE 89 % (95% CI 79–96 %; $p = 0,9$). Senzitivita a specifická v diagnostice maligních lézí byla 88,2 % (95% CI 72–97 %) a 92 % (95% CI 79–98 %) pro pCLE a 75,9 % (95% CI 56–89 %) a 100 % (95% CI 90–100 %) pro biopsie ($p > 0,3$). Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) a negativní prediktivní hodnota (NPV) k diagnostice (nebo k vyloučení) malignity byly 90,9 % (95% CI 77–97 %) a 90 % (95% CI 78–96 %) pro pCLE a 100 % (95% CI 90–100 %) a 83,3 % (95% CI 72–90 %) pro biopsie ($p > 0,1$). Senzitivita a specifická v diagnostice dysplazie byla 83,3 % (95% CI 81–98 %) a 93,5 % (95% CI 89–100 %) pro pCLE a 100 % (95% CI 91–100 %) a 88,7 % (95% CI 73–93 %) pro biopsie ($p > 0,2$). Definitivně, senzitivita a specifická pro diagnostiku benigní léze byla 92,9 % (95% CI 76,5–99,1 %) a 97,8 % (95% CI 88,5–99,9 %) pro pCLE a 89,3 % (95% CI 72–97,7 %) a 94,9 % (95% CI 83–99,4 %) u biopsií ($p > 0,2$).

Porovnání diagnostické přesnosti pCLE a standardních biopsií, senzitivita, specifická, PPV i NPV diagnostikovat/vyloučit maligní léze je znázorněna v tabulce 13. Příklady benigních a maligních lézí jsou znázorněny na obrázcích 12–15.

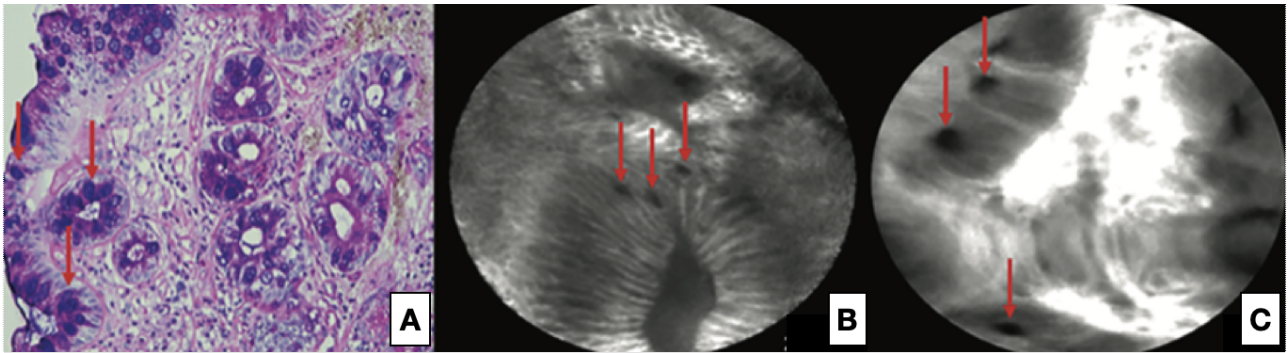
Detailní rozbor všech nesprávných diagnóz stanovených pomocí pCLE a biopsií je v tabulce 14.

Tabulka 13. Porovnání biopsií a pCLE.

	Diagnostická přesnost	Senzitivita	Specifická	PPV	NPV
Biopsie	85 % (76–94)	75,9 % (56–89)	100 % (90–100)	100 % (90–100)	83,3 % (72–90)
pCLE	89 % (79–96)	88,2 % (72–97)	92 % (79–98)	90,9 % (77–97)	90 % (78–96)

Diagnostická přesnost pCLE ve srovnání se standardními biopsiemi, senzitivita, specifická, PPV a NPV v diagnostice (k potvrzení a vyloučení) maligní léze. Hodnoty představují procenta s 95% intervalem spolehlivosti.

Zkratky: (PPV - Positive Predictive Value, pozitivní prediktivní hodnota; NPV - Negative Predictive Value, negativní prediktivní hodnota)

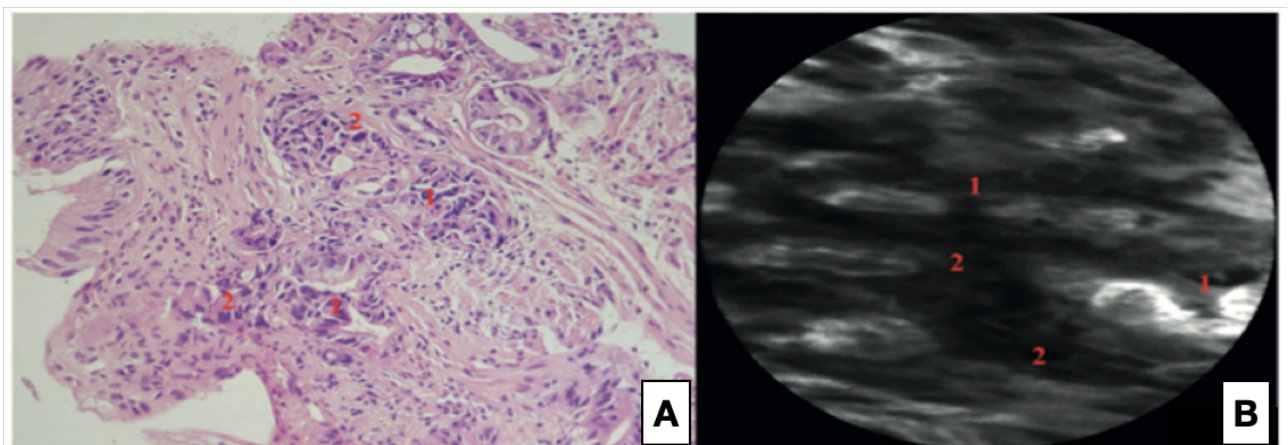


Obrázek 12. Shoda v diagnóze u pacienta s Barrettovým jícnem

(—> - pohárkové buňky odp. intestinální metaplazii). A. Standardní histopatologie, barvení alcianovou modří s PAS reakcí; B.C. pCLE.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

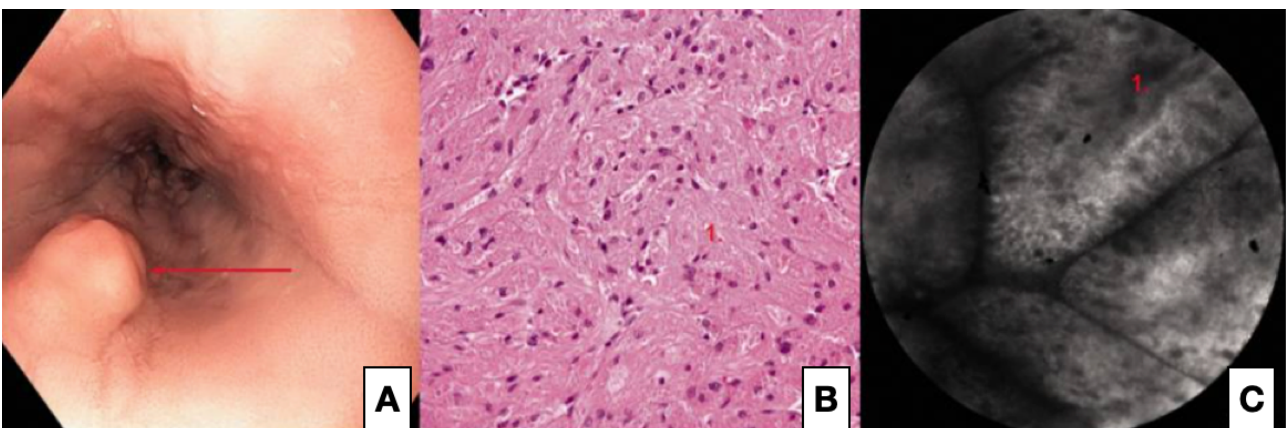


Obrázek 13. Shoda v diagnóze u pacienta s Barrettovým jícnem s high-grade dysplazií.

A. Standardní histopatologie, barvení hematoxylin eosin. 1. Nepravdělné žlázy. 2. Kulatá i nepravdělná jádra; 2. pCLE. 1. Větvené, nepravdělné žlázy. 2. Tmavé nepravdělné buňky.

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

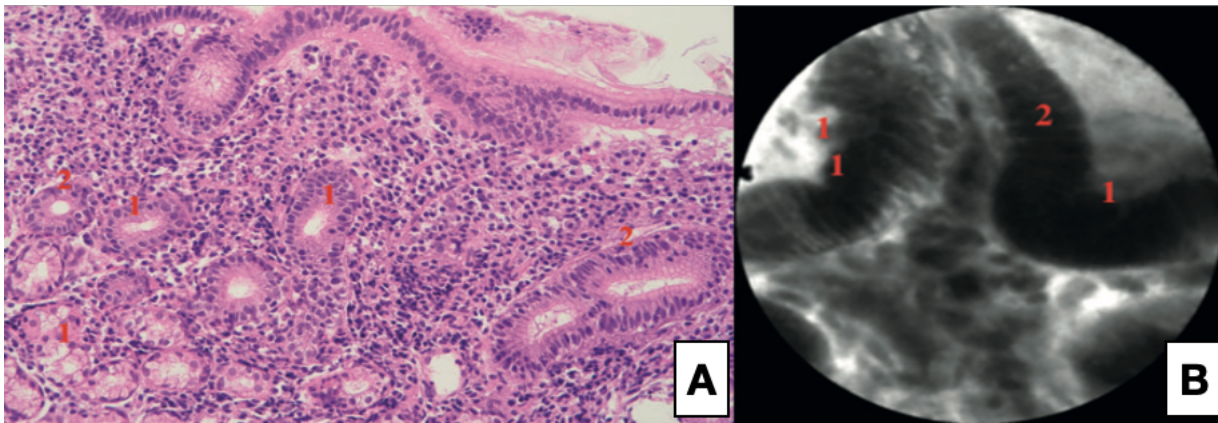


Obrázek 14. Shoda v diagnóze u pacienta s tumorem z granulárních buněk, tzv. Abrikosovův tumor.

A. Endoskopický nále (šipka označuje lézi); B. Histopatologický nále v barvení hematoxylin eosin, 1. Struktury tumoru; C. pCLE, 1. Struktury tumoru.

Zdroj: Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.



Obrázek 15. Neshoda v diagnóze - nesprávně stanovená diagnóza v pCLE.

- A. Standardní histopatologie v barvení hematoxylin eosinem znázorňuje chronickou aktivní gastritidu.
 B. pCLE s nerovným luminálním povrchem s tmavými buňkami nesprávně hodnocena jako dysplazie.
 1. Žlázky; 2. Regenerativní změny buněk (v pCLE imitující dysplastické změny).

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

Tabulka 14. Detailní analýza nesprávně hodnocených lézí v biopsiích a pCLE.

Pacient číslo	Hodnocení		Nesprávně hodnoceno	Definitivní diagnóza	Orgán	Důvod
	Bs	pCLE				
1.	N	S	HGD	AC	J	Malý vzorek v biopsii
2.	N	S	HGD	AC	J	Malý vzorek v biopsii
3.	N	N	pCLE: LGD; Bs: LGD	AC	J	Morf. znaky karcinomu v hlubších vrstvách
4.	S	N	HGD	AC	J	Nejednotná distribuce karcinomu
5.	X	N	nehodnoceno	AC	Ž	Nedostatečná kvalita videa
6.	S	N	HGD + karcinom in situ	Výrazně aktivní gastritida	Ž	Černé buňky, nerovné luminální okraje
7.	N	S	NET	Apokrinní metaplazie	J	Podobnost buněk - může imitovat NET
8.	S	N	AC	HGD	J	Nepravidelné okraje, tmavé a izolované buňky
9.	N	S	HGD	Hyperplastický polyp	Ž	Zánětlivé změny mimiku- jící dysplazii
10.	S	N	HGD	Hyperplastický polyp	J	Nepravidelné luminální okraje, černé buňky
11.	N	S	Nekrotická tkáň se zánětem	SCC	J	Nedostatečná velikost vzorku
12.	N	S	LGD	Hyperplastický polyp	Ž	Tmavé okraje mimikující LGD
13.	N	S	HGD	AC	Ž	Nedostatečný bioptický ma- teriál
14.	N	N	Bs: NET pCLE: benigní	AC	Ž	Bs: Neuroendokrinní složka byla úsekem AC
15.	N	S	HGD	AC	J	Biopsie odebrány povr- chově
16.	S	N	AC	LGD	J	Nepravidelný luminální okraj žlázek, tmavý epitel

Zkratky: AC – adenokarcinom; Bs - biopsie; HGD – high-grade dysplazie; J – jícen; LGD – low-grade dysplazie; N – neshoda; NET - neuroendokrinní tumor; pCLE – probe-based konfokální laserová endomikroskopie; S – shoda; SCC – spinocelulární karcinom; Ž – žaludek

5.4 4. PROJEKT

5.4.1 Charakteristika pacientů

Celkově bylo do studie zařazeno 56 pacientů (8 žen, 48 mužů); základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 15. U jednoho pacienta se vyskytla nevýrazná alergická reakce způsobená fluoresceinem.

Tabulka 15. Charakteristika pacientů zařazených do studie.

	LGD	HGD	AC
Počet pacientů	24 (43 %)	12 (21 %)	20 (36 %)
Průměrný věk – roky (rozmezí)	62 (48–79)	68 (51–77)	68 (42–81)
Medián délky BJ – cm (rozmezí)	3 (1–10)	4 (1–12)	1 (1–7)
Léčebné modality BORN:			
ER nebo ESD	2 (8,3 %)	1 (8,3 %)	6 (30 %)
ER/ESD + RFA	4 (16,7 %)	7 (58,3 %)	14 (70 %)
RFA	18 (75 %)	4 (33,3 %)	0 (0 %)
Medián sledování po terapii - měsíce (rozsah)	13 (4–65)	65 (4–97)	12 (4–66)

Zkratky: AC – adenokarcinom; BJ – Barrettův jícen; BORN – Barrett’s Oesophagus Related Neoplasia; ER – endoskopická resekce; ESD – endoskopická submukózní disekce; HGD – high-grade dysplazie; LGD – low-grade dysplazie; RFA – radiofrekvenční ablace

5.4.2 pCLE a biopsie v diagnostice perzistentní/rekurentní IM

Celkově u 36 pacientů (64,3 %) nebyla IM detekována v pCLE ani v biopsiích, zatímco 20 pacientů (35,7 %) mělo perzistující či rekurentní IM. pCLE detekovala IM u všech 20 pacientů (100 %), zatímco biopsie u 17 pacientů (85 %). IM nebyla odhalena pomocí biopsií u žádného pacienta, u kterého byla pCLE v hodnocení IM negativní. IM se ve všech případech vyskytla na makroskopicky normální neo-Z linii.

5.4.3 pCLE a biopsie v diagnostice rekurentní neoplazie

Pouze u jednoho pacienta (1/56; 1,8 %) byla diagnostikována recidivující LGD pomocí pCLE, zatímco histologicky nebyla zastižena. Tento pacient podstoupil úspěšnou terapii re-RFA (HALO 60). Jak bylo

zmíněno v oddílu statistické analýzy, nebylo možné porovnat účinnost biopsií a pCLE v diagnostice rekurentní neoplázie, jelikož se nevyskytly další případy recidivy BORN.

5.4.4 Diagnostická přesnost

Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota pCLE a biopsií se významně nelišily a jsou uvedeny v tabulce 16. Shoda mezi pCLE a histopatologickou detekcí IM byla 94,6 %. Cohens kappa statistika ukázala téměř dokonalou shodu mezi dvěma testy (0,88; 95% CI 0,747 - 1,000).

Tabulka 16. pCLE vs. biopsie v detekci IM po terapii BORN.

	pCLE	Biopsie	p hodnota
Senzitivita	100 % (95% CI: 80–100)	85 % (95% CI: 62,1–96,8)	0,25
Specifická	100 % (95% CI: 88–100)	100 % (95% CI: 88–100)	1
PPV	100 % (95% CI: 80–100)	100 % (95% CI: 77,1–100)	1
NPV	100 % (95% CI: 88–100)	92,3 % (95% CI: 78–98)	1
Diagnostická přesnost	100 % (95% CI: 93,6–100)	94,6 % (95% CI: 85,1–98,9)	0,25
Shoda mezi pCLE a histopatologií	94,6 %		0,88 (95% CI:0.747–1.000)*

Zkratky: NPV – Negative Predictive Value, negativní prediktivní hodnota; pCLE – probe-based konfokální laserová endomikroskopie; PPV – Positive Predictive Value, pozitivní prediktivní hodnota

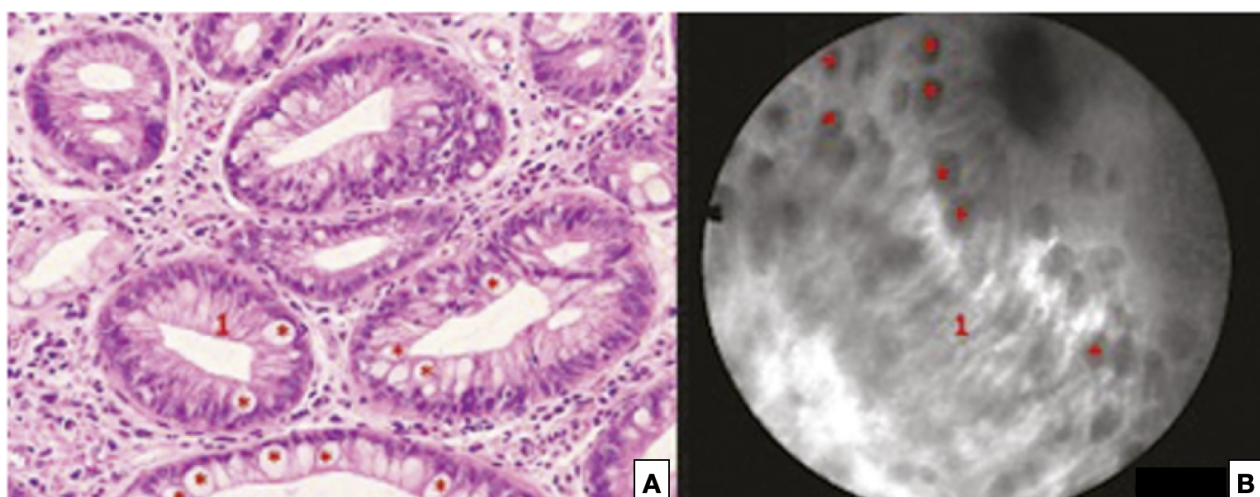
5.4.5 Analýza detekovaných žlázek a pohárkových buněk

Celkově bylo odebráno 639 bioptických vzorků (8–12 vzorků na pacienta), z toho 195 biopsií 17 pacientům, u kterých byla IM detekována biopticky. U těchto pacientů byla IM zachycena v 26 biopsiích (13 %), zatímco 169 biopsií (87 %) IM nezachytilo. Navíc u těchto 17 pacientů biopsie detekovaly 250 žlázek a 1407 pohárkových buněk, na druhou stranu pCLE 278 žlázek obsahujících 1784 pohárkových buněk (tabulka 17). Pomocí pCLE bylo detekováno významně více pohárkových buněk (medián 43 na pacienta, rozmezí 7-676) v porovnání se standardními biopsiemi (medián 12 na pacienta, rozmezí 3–659), $p = 0,01$.

Tabulka 17. Porovnání počtu detekovaných žlázek a pohárkových buněk v pCLE a biopsií.

	pCLE	Biopsie	<i>p</i> hodnota
Počet detekovaných žlázek	278	250	
Počet žlázek na 1 pacienta (medián, rozsah)	8 (4–95)	3 (1–87)	0,45
Počet detekovaných pohárkových buněk	1784	1407	
Počet pohárkových buněk na 1 pacienta (medián, rozsah)	43 (7–676)	12 (3–659)	0,01

Zkratky: pCLE – probe-based konfokální laserová endomikroskopie



Obrázek 16. Shoda v detekci intestinální metaplazie (pohárkových buněk) v biopsii a pCLE.

A. Standardní histopatologie v barvení hematoxylin eosin. B. pCLE.

1. Epitel žlázek. * Pohárkové buňky (intestinální metaplazie).

Zdroj: Marek Kollár, Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM, Praha.

Jan Martínek, Klinika hepatogastroenterologie, IKEM, Praha.

6 DISKUSE

6.1 1. PROJEKT

V naší studii jsme provedli u pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu porovnání endoskopické a chirurgické léčby a stanovili jsme rizikové faktory generalizace a postižení lymfatických uzlin.

Zjistili jsme, že endoskopická terapie poskytuje slibné výsledky i v léčbě pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu, který je v současnosti považován za jednoznačnou indikaci k chirurgické léčbě, je-li tato možná. Celkem 80 % pacientů léčených endoskopicky dosáhlo kompletní endoskopické remise. Za vyléčené pacienty můžeme považovat ty, kteří dosáhli dlouhodobé remise, což bylo 62,9 % pacientů léčených pouze endoskopicky a 86,7 % léčených chirurgicky. Nutno dodat, že ve skupině pacientů léčených pouze endoskopicky byli i jednoznační kandidáti k ezofagektomii, kterou kvůli závažným komorbiditám nebo odmítavému postoji k chirurgii nepodstoupili. Tento fakt je zodpovědný za „horší“ výsledky endoskopické léčby ve smyslu kratšího přežití, a tudíž vyšší mortality. Důležité je se na tyto výsledky podívat z jiné stránky – až u 43,3 % pacientů, kteří podstoupili ezofagektomii, byla endoskopická léčba dostatečná a kurativní, jelikož detailní histopatologické vyšetření resekátu nezastihlo rezidua malignity v jícnu a v LU nebyly detekovány metastázy, mikrometastázy či izolované nádorové buňky.

U pacientů, kteří podstoupili chirurgickou léčbu, byla v definitivním chirurgickém resekátu u 33,3 % zastižena lokální rezidua malignity. U většiny těchto pacientů jsme tento nález očekávali, jelikož léze nebyla endoskopicky vzhledem k pokročilosti odstraněna kompletně, tj. histopatologie endoskopického resekátu ukázala R1 resekci. Navíc v pěti případech byla skutečná invaze tumoru hlubší než invaze popsána v endoskopickém resekátu. Tento fenomén lze vysvětlit několika způsoby: 1) mohlo jít o “podhodnocení” hloubky invaze; 2) skutečná hloubka invaze v definitivním chirurgickém resekátu nemusela být v endoskopickém resekátu přítomná a tudíž nebyla hodnocena; 3) vývojem dané léze v čase, zejména u pacientů, u kterých nebylo dosaženo R0 resekce nebo u kterých byl delší časový interval mezi endoskopií a ezofagektomií. Z uvedeného vyplývá, že pacienti, u kterých nebyl endoskopicky karcinom odstraněn kompletně (R1 resekce) a nemají kontraindikace k chirurgii, mají být indikováni k ezofagektomii.

Nevýhodou ezofagektomie je její relativně vysoká mortalita a morbidita. Finks JF a kol. provedli studii, kde stanovili mortalitu po ezofagektomii v průběhu 10 let ve dvouletých intervalech na 10 %, 10,8 %, 10 %, 9,2 % a 8,9 % (Finks JF. et al., 2011). Pro srovnání, nejvyšší zjištěné hodnoty mortality dalších rizikových operací byly 7,3 % u pankreatektomie, 5,3 % u resekce plic a 4,3 % u cystektomie. Tato data jednoznačně poukazují na závažnost a míru rizika ezofagektomie. Mortalita navíc stoupá u pacientů s výraznějšími komorbiditami, což ukázali Asti E. a kol. v metaanalýze. Společná mortalita u pacientů se závažnějšími komorbiditami byla až 18 % (Asti E. et al., 2018). V našem souboru byla mortalita ve srovnání se zmíněnými studiemi nižší, 6,7 % (2/30). Nicméně celková mortalita v chirurgické skupině asociována s výkonem byla 11 %. Nutno dodat, že jeden pacient zemřel na dehiscenci anastomózy, přičemž v chirurgickém resekátu nebyla zastižena

rezidua karcinomu a LU byly negativní včetně průkazu mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk (endoskopická resekce byla tedy kurativní). Nižší mortalita ezofagektomie v našem souboru může být dána dvěma faktory. Za prvé, všichni pacienti byli operováni v centru s největší zkušeností s resekcemi jícnu v České republice, a za druhé, pacienti s významnými komorbiditami byli léčeni endoskopicky a chirurgickou léčbu nepodstoupili.

Dále jsme v naší studii provedli detailní analýzu postižení LU či generalizace u pacientů s “high-risk” karcinomy jícnu. Přesné výsledky jsou velmi cenné, jelikož hranice endoskopické léčby jsou určeny na základě rizika postižení lymfatických uzlin. Metastázy v LU či generalizace byly zastiženy u 25 % (4/16) pacientů s karcinomem s sm1 invazí. U všech těchto pacientů byl diagnostikován karcinom s rizikovými faktory. Na druhou stranu, žádný z pacientů s sm1 karcinomem bez rizikových faktorů neměl metastázy či mikrometastázy v LU ani generalizaci. Manner a kol. (Manner H. et al., 2013) publikovali analýzu metastatického postižení LU u pacientů s karcinomem se submukózní invazí. Ukázali, že metastázy byly zastiženy ve 2 % LU s „low-risk“ sm1 AC, v 9 % LU s „high-risk“ sm1 AC a v 8,3 % u „low-risk“ sm2 AC. Na základě těchto výsledků usuzovali, že u pacientů s „low-risk“ sm1 karcinomy by mohla být endoskopická léčba vhodnou alternativou k ezofagektomii. Významný rozdíl v procentu postižení mezi našimi studiemi může být dán zejména rozdílnou metodikou. Za prvé, studie provedena Mannerem a kol. detekovala v LU „pouze“ přítomnost metastáz, zatímco naše studie hodnotila ve všech LU i mikrometastázy a izolované nádorové buňky včetně imunohistochemického průkazu, což umožňuje nepochybně přesnější záchyt maligních struktur. Za druhé, až 74 % pacientů v sérii publikované Mannerem podstoupilo ezofagektomii, takže riziko metastáz bylo nižší. Za třetí, orgánové a uzlinové metastázy detekovali pomocí endoskopické ultrasonografie (sami to považovali za nedostatek jejich studie), zatímco v naší studii bylo provedeno kontrolní vyšetření CT hrudníku i břicha, které má vyšší citlivost v detekci metastáz.

Metastázy v LU či generalizace byly v našem souboru zastiženy u karcinomů s sm2 invazí ve 20 % a u sm3 invaze ve 36,4 %. Vyšší procento pozitivních uzlin bylo pochopitelně očekáváno. Zajímavým faktem může být nepoměr u pacientů s sm1 invazí s rizikovými faktory, který představoval 57,1 %. To může být pravděpodobně způsobeno až 3x nižším počtem pacientů s sm1 karcinomem ve srovnání se skupinou s sm3 karcinomy. Vyšší procento postižení LU koreluje s invazí nádoru do hlubších partií submukózy. Teoreticky by se to dalo vysvětlit větším počtem lymfatických cév a/nebo větším průměrem jejich lumen v hlubších vrstvách submukózy, což by umožňovalo snadnější prorůstání nádorových elementů do stěny cév a pak následné metastazování do LU.

Otázkou je, jaký je skutečný prognostický význam mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk. Žádný z pacientů, u nichž byly detekovány mikrometastázy, nezemřel. Na druhou stranu nemůžeme spolehlivě predikovat vývoj těchto ložisek v lymfatických uzlinách v čase. Teoreticky by velmi pravděpodobně došlo ke zvětšení ložisek z mikrometastatického na metastatický a tím by se zhoršovala i prognóza pacienta. Problematika mikrometastáz má také etickou stránku věci. Má být pacient o zjištění mikrometastázy či izolovaných nádorových buněk informován?

Na základě těchto výsledků jsme provedli detailní analýzu histopatologických prediktivních faktorů ve vztahu k metastázám do LU a generalizaci. Za jediný statisticky významný negativní prediktivní faktor lze považovat pouze angioinvasi a lymfangioinvasi. Tento fakt se pochopitelně nabízí jako logické vysvětlení progresu v sekvenci karcinom -> lymfangioinvasi a/nebo angioinvasi -> metastatické postižení LU a/nebo postižení orgánů. Je zajímavé, že s angio/lymfangioinvasi nekoreloval např. horší grading tumoru či vyšší disociace nádorových buněk. Na druhou stranu, absence lymfangioinvasi či angioinvasi zcela neeliminuje riziko metastatického postižení. V našem souboru tomu nasvědčuje fakt prokázané mikrometastázy u pacienta, kde nebyla lymfangioinvasi detekována. Tato situace může být zdůvodněna následovně. Na prvním místě se nabízí vysvětlení, že každá metoda má určité limity a ani v případě kompletního zpracování vzorku by nebyla vyšetřena celá tkáň. Dalším vysvětlením by mohla být situace, že angioinvasi nebyla zastižena, ale není možné vyloučit přítomnost cirkulujících nádorových buněk, ze kterých mohou vznikat metastázy. Obdobné závěry publikovali také Boys a kol. a Nentwich a kol. (Boys JA. et al., 2016) (Nentwich MF. et al., 2014). V jejich souborech představovala lymfangioinvasi nejdůležitější rizikový faktor metastázování do LU. Boys a kol. také naznačili, že metastatický potenciál může záviset na množství rizikových faktorů. V případě koincidence 3 rizikových faktorů (G3-4, L+ a hloubka invaze > 500 µm) mělo 50 % pacientů metastázy v LU. Tento fakt jsme retrospektivně analyzovali v našem souboru a došli jsme ke stejnému výsledku, a to i v případě, že jsme rizikové faktory definovali odlišně (G3-4, L+, A+, TCD3). Pokud byly u pacienta přítomny všechny čtyři rizikové faktory, až u 57,1 % byla zastižena generalizace nebo metastázy do LU.

Na základě výsledků porovnání obou léčebných modalit usuzujeme, že u pacientů, u kterých je kontrindikována ezofagektomie, může být endoskopická resekce považována za vhodnou terapeutickou alternativu.

Naše studie má několik nedostatků. Za prvé, do studie byl zařazen nižší počet pacientů. Za druhé se jedná o retrospektivní analýzu, přestože je založena na prospektivním sběru dat. Za třetí, endoskopicky byli léčeni i pacienti, u kterých byla vzhledem k pokročilosti karcinomu jednoznačně preferována ezofagektomie, což nepochybně přispělo ke zhoršení výsledků endoskopické léčby. Jedině multicentrická prospektivní randomizovaná studie může jednoznačně odpovědět na otázku, jak pokročilý časný karcinom jícnu je ještě řešitelný endoskopicky.

Na druhou stranu, studie má i silné stránky. Tou zásadní je, že byla provedena detailní analýza lymfatických uzlin. Většina studií, které hodnotily riziko postižení LU histopatologicky, detekovala pouze metastázy, kdežto naše studie analyzovala i přítomnost mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk.

Závěrem lze shrnout, že endoskopická terapie může být vhodnou alternativou léčby “high-risk” karcinomů jícnu u pacientů, a to nejenom u těch, kteří nemohou podstoupit ezofagektomii. Pacienti s

R1 resekci by měli být referováni k chirurgii. Angioinvaze a lymfangioinvaze jsou statisticky významnými rizikovými faktory v progresi časných karcinomů jícnu.

6.2 2. PROJEKT

V naší studii jsme porovnávali a korelovali nálezy imunohistochemického průkazu p53 s definitivní diagnózou stanovenou z hematoxylin eosinu v diagnostice benigních, dysplastických i maligních lézí sliznice jícnu. Zjistili jsme, že použití IHC průkazu p53 může být v určitých indikacích spolehlivou pomocnou metodou v diagnostice lézí jícnu. p53 je vhodným pomocným imunohistochemickým markerem k odlišení benigních (např. reaktivních) a dysplastických lézí, a to jak u LGD ($p = 0,0114$), tak i HGD ($p < 0,0001$). Průkaz p53 ale není spolehlivý v odlišení stupně dysplazie. Diagnostika AC nečiní obvykle problémy, proto marker p53 v diagnostice karcinomů jícnu není standardně užíván, nicméně v naší studii byl proveden ke zjištění procenta mutovaných a nemutovaných fenotypů u karcinomu. U všech pacientů s AC byl zastižen pouze mutovaný fenotyp p53.

Design naší studie byl odlišný ve srovnání s mnohými jinými studiemi zabývajícími se významem p53 v diagnostice lézí jícnu. Větší část studií stanovovala průkaz p53 v případech, kde nebyla diagnóza na úrovni HE jednoznačná a průkaz p53 byl považován za směrodatný (Januszewicz W. et al., 2022). Nejprve vyhodnotili vzorky z HE a u nejasných případů byl použitý IHC průkaz p53 a definitivní diagnóza byla stanovena s velkým ohledem na výsledek p53. Tento postup je používán zcela běžně v rutinní histopatologické diagnostice.

Metodika naší studie byla v podstatě reverzní. Definitivní diagnóza byla stanovena nejprve z HE na základě jednoznačných morfologických a cytologických znaků nezávisle dvěma specializovanými gastrointestinálními patology. U všech vzorků, kde byla jednoznačná shoda, jsme následně provedli průkaz p53. Léze, u kterých nebyla diagnostická shoda mezi patology nebo se v imunohistochemickém průkazu vykrájely, byly ze studie vyřazeny. Cílem tohoto reverzního přístupu bylo stanovit spolehlivost průkazu p53 v jednotlivých indikacích a způsob, jak by měl být nález patologem interpretován.

Kaye PV a kol. provedli studii, kde ukázali, že p53 je vhodným pomocným markerem pro rutinní použití v diagnostice dysplastických lézí a jejich odlišení od nedysplastických. Nicméně, uvedli, že p53 spolehlivě nedokázala odlišit LGD léze od HGD lézí, a proto doporučují zjednodušení diagnózy týkající se dysplastických změn na „přítomnou“, „neurčitou“ a „nepřítomnou“ (Kaye PV. et al., 2016). V podstatě k stejným výsledkům jsme dospěli také. Naše analýza ukázala, že průkaz p53 je vhodným pomocným imunohistochemickým markerem k odlišení benigních/nedysplastických a dysplastických lézí a to jak u LGD ($p = 0,0114$), tak i HGD ($p < 0,0001$). Odlišení HGD a nedysplastických, zejména reaktivních lézí obvykle v praxi nečiní potíže. Naopak odlišení LGD od reaktivních lézí jícnu je jedním z nejčastějších problémů v klinické praxi v oblasti onemocnění jícnu, jak ukázala například práce autorů z Nizozemska, kde pouze

27 % pacientů mělo ve druhém expertním čtení potvrzenou LGD v terénu BJ (Duits LC. et al., 2015). Právě v těchto indikacích je přínos stanovení p53. Naše výsledky potvrzují, že p53 nedokáže spolehlivě odlišit LGD a HGD.

Dalším cílem jejich studie bylo porovnání spolehlivosti interpretace v diagnostice dysplazie. Ukázali, že interpretace p53 je spolehlivější než diagnostika dysplazie z běžného histopatologického vyšetření při barvení HE, avšak za podmínky tréninku. Tato otázka nebyla v naší studii cíleně zkoumána, nicméně na základě našich výsledků (např. normální wild-type obrazu u HGD) můžeme usuzovat na uznávanou „poučku“ v patologické komunitě: „V případě, že nález v IHC nekoreluje s nálezem v hematoxylinu eosinu, je rozumné řídit se/upřednostnit morfolonii (architektonické a cytologické změny) v hematoxylin eosinu.“

Několik studií ukázalo, že abnormální fenotyp p53 identifikuje pacienty s BJ s vyšším rizikem progresu i u těch, kteří v době diagnózy neměli v biopsii zastiženy dysplastické změny (Redston M. et al., 2022) (Tokuyama M. et al., 2020). V naší studii jsme zachytili jednoho pacienta, který měl diagnostikovaný BJ bez dysplazie, ale průkaz p53 byl pozitivní a v průběhu 5 let se u něj vyvinula low-grade dysplazie, tudíž abnormální/mutovaný fenotyp p53 může být důležitým prognostickým faktorem i při nepřítomnosti dysplazie. Jeden ze dvou pacientů, u kterých bylo p53 negativní, byl v minulosti endoskopicky léčen pro AC jícnu a v současné biopsii dysplazie zastižena nebyla. V obou případech se jednalo o abnormální/mutovaný fenotyp. Kastelein F. a kol. analyzovali biopsie 635 pacientů v prospektivní kohortě a stanovili imunohistochemicky expresi proteinu p53 (Kastelein F. et al., 2013). Dospěli k závěru, že pozitivní prediktivní hodnota pro neoplastickou lézi se zvýšila z 15 % s diagnostikovanou LGD na 33 % v případě současné aberantní exprese p53. Na základě těchto výsledků dospěli k závěru, že aberantní exprese proteinu p53 je spojena se zvýšeným rizikem progresu neoplastických lézí u pacientů s BJ a zdá se být vhodnějším prediktorem progresu než histologická diagnóza LGD.

Do naší studie bylo zařazeno 18 pacientů s AC, u kterých jsme ve 100 % pozorovali abnormální fenotyp. V 50 % představoval nulový (negativní) fenotyp a v 50 % pozitivní.

Na základě výše zmíněných nálezů (abnormální fenotyp u dysplastických lézí a u AC) lze usuzovat, že molekulárně-genetické změny jsou přítomné již u pacientů s dysplastickými lézemi.

Naše studie má několik nedostatků. Za prvé, nižší celkový počet lézí zahrnutých do studie a zejména nižší počet dysplastických lézí, což je způsobeno faktem, že tyto změny byly častokrát pouze fokální a v průkazu p53 již nebyly zastiženy. Za druhé, do studie byly zahrnuty vzorky získané klešťovými biopsiemi i vzorky z endoskopických resekátů (ER či ESD) a nálezy v p53 nebyly mezi sebou srovnávány. Za třetí, nebylo možné spolehlivě stanovit význam p53 v progresi lézí, jelikož pouze u jednoho z pacientů byla nalezena progresu z léze bez dysplazie do dysplastické.

Závěrem lze říct, že imunohistochemický průkaz p53 je vhodnou pomocnou metodou v diagnostice lézí jícnu. Je vhodnou doplňkovou metodou v odlišení dysplastických a nedysplastických lézí. V případě silné blokové pozitivivity průkaz p53 koreluje s nálezem HGD, nicméně odlišení LGD od HGD není

přesvědčivé. Použití p53 by mělo předejít nesprávné diagnóze, zejména ve smyslu nadhodnocení léze. Zcela klíčová je znalost odlišného přístupu hodnocení ve srovnání s jinými imunohistochemickými průkazy, který hodnotíme jako normální/nemutovaný, tzv. wild-type obraz a abnormální/mutovaný. Průkaz p53 je důležitý v stanovení rizika progresu lézí jícnu. Nespornou výhodou použití p53 je jeho dostupnost (nízká cena) a rychlost zhotovení.

6.3 3. PROJEKT

V naší prospektivní studii jsme porovnávali diagnostickou přesnost pCLE vs. biopsie u pacientů s viditelnými lézemi sliznice jícnu a žaludku. Zjistili jsme, že obě metody mají vynikající diagnostickou přesnost (89 % pro pCLE vs. 85 % pro biopsie) s uspokojivou senzitivitou a specificitou diagnostikovat maligní, dysplastické a benigní léze. Biopsie je považována za zlatý standard v histopatologické diagnostice u pacientů s gastrointestinální patologií. Diagnóza založená na biopsiích je považována za spolehlivou, ale ne dokonalou. Například probíhají kontroverze o diagnostické přesnosti biopsií v detekci dysplazie nízkého stupně u pacientů s BJ (LGD je často nadhodnocena) (Duits LC. et al., 2015). Ani biopsie z viditelné léze nejsou dostatečně přesné, aby poskytly spolehlivou diagnózu. Dvě studie ukázaly, že definitivní diagnóza značného počtu viditelných neoplastických lézí musela být změněna po zhodnocení vzorků z ER (Stefanova M. et al., 2013) (Pailoor K. et al., 2013). V této studii ukázaly biopsie trend snížené citlivosti k diagnostice malignity (76 %). Ve většině nesprávně diagnostikovaných případů biopsie odhalily dysplazii nebo nekrotickou tkáň. Byly tedy vyvinuty a testovány nové diagnostické přístupy s cílem zlepšit detekci lézí i diagnostickou přesnost. pCLE představuje relativně novou metodu umožňující „virtuální“ mikroskopickou diagnostiku. Existuje několik důvodů, proč může být pCLE užitečným nástrojem, který může za určitých okolností nahradit standardní techniky odběru vzorků tkání. Za prvé, může poskytnout rychlou diagnózu. Za druhé, není nutný žádný odběr tkáně (a proto u pacientů s antikoagulancii nehrozí žádné riziko nežádoucích účinků, jako je krvácení). Za třetí, sonda může zkoumat výrazně větší oblast ve srovnání s biopsií. Za čtvrté, pCLE může vyhodnotit vyškolený endoskopista. Konečně, po pCLE nedochází k žádnému jizvení a je dobře známo, že biopsie by neměly být odebírány z plochých kolorektálních lézí (jizvení ztěžuje následnou endoskopickou resekci). Použití pCLE může navíc i zabránit zbytečné endoskopické resekcii lézí, které nejsou indikovány k endoskopickému odstranění (např. tuberkulóza, lymfom).

pCLE může být akceptována jako standardní metoda, pokud splňuje určitá kritéria. ASGE (American Society for Gastrointestinal Endoscopy) navrhla prahové hodnoty výkonu v dokumentu Preservation and Incorporation of Valuable Endoscopic Innovations (PIVI), které jsou definovány jako a) zobrazovací technologie s cílenými biopsiemi, která by měla mít senzitivitu na pacienta $\geq 90\%$ a negativní prediktivní hodnota $\geq 98\%$ pro detekci HGD nebo časného AC u pacientů s BJ ve srovnání se současným standardním protokolem a b)

zobrazovací technologie, která by měla mít dostatečně vysokou specifitu (80 %), aby umožnila snížení počtu biopsií (Sharma P. et al., 2012).

V naší studii nebyla kritéria PIVI pro pCLE splněna, protože senzitivita byla 88 % a negativní prediktivní hodnota 92 %. Nicméně hodnoty zjištěné v naší studii lze považovat za uspokojivé, protože ani standardní biopsie nedosáhly prahových hodnot a naše léze zahrnovaly oba typy karcinomů jícnu a také karcinom žaludku. Několik studií ukázalo, že pCLE může poskytnout srovnatelnou nebo dokonce lepší diagnostickou přesnost ve srovnání se standardními biopsiemi u pacientů s AC jícnu (Sharma P. et al., 2011) (Kiesslich R. et al., 2006) (Pohl H. et al., 2008), SCC jícnu (Pech O. et al., 2008) (Huang J. et al., 2015) nebo AC žaludku (Li WB. et al., 2011).

Většina studií hodnotících roli pCLE v detekci HGD/AC u pacientů s BJ zkoumala, jestli přidání pCLE k jiným diagnostickým metodám může snížit počet náhodných biopsií. Sharma a kol. zjistili, že kombinace narrow band imaging s vysoko-rozlišovací endoskopií s bílým světlem a s pCLE vedla k vynikající senzitivitě (100 %) v diagnostice AC jícnu a/nebo HGD, a proto bylo možné vyhnout se biopsiím u 60 % pacientů, pokud byly všechny tři metody negativní (Sharma P. et al., 2011). Bertani a kol. prokázali senzitivitu, specifitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu pCLE 100 %, 83 %, 67 % a 100 % pro detekci dysplazie u pacientů s BJ (Bertani H. et al., 2013).

Jedna důležitá prospektivní studie zkoumala, zda by pCLE mohla nahradit biopsie při endoskopii u pacientů s BJ. Celkově analyzovali 670 párů biopsií a videosekvencí pCLE, přičemž neoplazie byla histologicky diagnostikovaná u 8,3 %. Specifita a negativní prediktivní hodnota pCLE při vyloučení neoplazie byly 97 %, resp. 93 %. Jak pozitivní prediktivní hodnota, tak citlivost byly spíše nízké (46 % a 28 %). Autoři dospěli k závěru, že pCLE lze považovat za non-inferiorní k endoskopickým biopsiím k vyloučení neoplazie, ale nemůže nahradit standardní biopsie kvůli nízké pozitivní prediktivní hodnotě a senzitivitě (Bajbouj M. et al., 2010).

Naše studie prokázala, že u pacientů s BJ a s viditelnou lézí poskytuje pCLE ve většině případů spolehlivou diagnózu HGD/AC. pCLE nediodagnostikovala správně AC jícnu u 2/20 pacientů, zatímco biopsie se zmýlily u 6/20 pacientů. U pacientů s BJ (bez viditelné léze) spočívá potenciální užitečnost pCLE ve zlepšení diagnostické výtěžnosti dysplazie a ve snížení celkového počtu biopsií. U pacientů s viditelnou lézí poskytuje pCLE srovnatelné výsledky s biopsií.

pCLE se zdá být spolehlivá v diagnostice SCC jícnu. Pech a kol. prokázali vynikající přesnost pCLE v diagnostice histologicky prokázaného SCC u 27 pacientů, jelikož všechny léze byly správně diagnostikovány dvěma endoskopisty (Pech O. et al., 2008). V jiné studii byla senzitivita, specifita a diagnostická přesnost pCLE u pacientů se SCC > 90 % (Guo J. et al., 2015). V naší studii jsme vyšetřili 9 pacientů se SCC a u všech byl správně diagnostikován pomocí pCLE, zatímco biopsie nedokázaly SCC diagnostikovat správně u jednoho pacienta, jelikož byla zachycena pouze nekrotická tkáň bez vitálních maligních nádorových buněk. Následující úspěšná chemoradioterapie byla podána pouze na základě výsledků pCLE.

pCLE se zdá být spolehlivá také v diagnostice žaludečních lézí. V metaanalýze 23 studií byla souhrnná senzitivita a specificita pro správnou diagnózu žaludečního AC 91 % (95% CI 88–94 %) a 99 % (95% CI 99–99 %). V naší studii mělo pět pacientů žaludeční AC. Biopsie i pCLE nediodagnostikovaly správně karcinom žaludku u dvou pacientů (tabulka 14). Jeden případ nesprávné diagnózy pCLE byl způsobem špatnou kvalitou obrazu.

Naše studie se lišila od přechozích studií tím, že zahrnovala neselektované pacienty s viditelnou lézí s neznámou histopatologií. Tento design odráží realističtější klinickou praxi, protože endoskopista obvykle vyšetřuje celé spektrum pacientů. Celková diagnostická přesnost pCLE v diagnostice lézí jícnu a žaludku byla srovnatelná s biopsiemi. Domníváme se tedy, že pCLE může nahradit standardní biopsie u pacientů s viditelnými lézemi jícnu/žaludku. Hlavní nevýhodou pCLE je vysoká cena, která je výrazně vyšší ve srovnání s histopatologií (500 USD za pCLE vs. 150 USD za pět biopsií) a pCLE zatím není hrazena z veřejného pojištění.

Naše studie má několik nedostatků. Za prvé, zahrnuli jsme 67 pacientů se 74 lézemi, a i když byl minimální počet plánovaných pacientů 50, velikost našeho souboru je stále omezená. Za druhé, všechny sekvence byly hodnoceny off-line a hodnocení v reálném čase nebylo provedeno. Nakonec jsme nezkoumali schopnost pCLE hodnotit další důležité charakteristiky, jako je grading, disociace nádorových buněk a tak dále.

Silnou stránkou naší studie je její atypický design a skutečnost, že definitivní diagnóza byla (ve většině případů) potvrzena z resekcčního vzorku.

Závěrem lze říci, že naše studie ukázala, že pCLE je porovnatelná se standardními biopsiemi, pokud jde o celkovou diagnostickou přesnost pro správnou diagnostiku viditelných lézí jícnu/žaludku. Naše výsledky naznačují, že u pacientů s viditelnou jícnovou/žaludeční lézí by mohla být pCLE považována za standardní metodu.

6.4 4. PROJEKT

V naší studii jsme prokázali, že pCLE má srovnatelnou účinnost se standardními biopsiemi při detekci perzistující nebo recidivující IM u pacientů, kteří podstoupili endoskopickou léčbu BORN (Barrett's Oesophagus Related Neoplasia). Kromě toho byla pCLE stejně účinná jako biopsie při vyloučení rekurentní intestinální neoplazie a konečně pCLE detekovala významně více pohárkových buněk než biopsie u pacientů s IM.

Barrettův jícen je premaligní stav. Pacienti s BJ bez dysplazie mají zvýšené riziko rozvoje AC jícnu s roční incidencí 0,12–0,2 %, u pacientů s LGD 10–15 % a u pacientů s HGD 13–25 % (Martinek J. et al., 2008) (Bhat S. et al., 2011) (Curvers WL. et al., 2010) (Hvid-Jensen F. et al., 2011) (Rastogi A. et al., 2008). Z tohoto důvodu jsou pacienti s BJ bez dysplazie endoskopicky sledováni včetně odběru biopsií za účelem

časné detekce dysplazie nebo časného karcinomu, aby v případě nálezu následovala účinná mini-invazivní léčba.

Pacienti s LGD, HGD nebo časným AC jsou dobrými kandidáty pro endoskopickou léčbu, sestávající z ER nebo ESD (jakákoliv viditelná léze, nejenom karcinom) a/nebo ablačních metod (nejčastěji RFA) nebo kombinace resekce+ablace. Endoskopická resekce kombinovaná s RFA je dnes považována za zlatý standard v léčbě pacientů s časným AC jícnu. Samotná radiofrekvenční ablace je léčbou první volby u pacientů s plochým BJ s potvrzenou LGD nebo HGD (Fitzgerald RC. et al., 2014) (Shaheen NJ. et al., 2016) (Weusten B. et al., 2017) (Bennett C. et al., 2012).

Cílem endoskopické léčby je odstranění jak neoplazie, tak i zbývajících segmentu BJ. V ideálním případě by pacient po úspěšné endoskopické léčbě neměl mít viditelný segment BJ, neoplazii ani IM; kompletní remise neoplazie a IM jsou považovány za hlavní cíl u pacientů podstupujících endoskopickou léčbu BORN. Několik studií prokázalo, že endoskopická léčba je účinná a bezpečná. Rozmezí kompletní remise neoplazie a IM jsou 80–93 % a 70–88 % (Krajciova J. et al., 2019) (Phoa KN. et al., 2016) (Orman ES. et al., 2013) (Shaheen NJ. et al., 2009).

Nicméně rekurence jak BJ, neoplazie, tak i perzistující IM se může vyskytnout i po úspěšné endoskopické terapii. Například Orman a kol. v metaanalýze 18 studií s 3802 pacienty prokázali, že CR-IM bylo dosaženo u 78 % a CR-N u 91 % pacientů (Orman ES. et al., 2013). Recidiva IM a neoplazie byly zjištěny u 13 % a 1,6 % pacientů. Naše nedávno publikovaná studie zjistila, že mezi pacienty s BORN, kteří podstoupili endoskopickou léčbu, dosáhlo 98,5 % pacientů CR-N a 77,9 % pacientů dosáhlo CR-IM (Krajciova J. et al., 2019). Neoplazie a IM rekurovaly u 4,5 % a 15 % pacientů. Za zmínku stojí, že k většině recidiv pacientů IM došlo bez recidivy makroskopicky viditelného segmentu BJ. Také další studie uvádějí recidivu IM ve 2–20 % a recidivu neoplazie u 2–7 % (Haidry RJ. et al., 2013) (Wolf WA. et al., 2015).

Proto pacienti po úspěšné endoskopické léčbě BORN stále potřebují endoskopický dohled. Na rozdíl od pacientů s BJ nejsou rizikové faktory recidiv neoplazie nebo IM plně objasněny, a proto jsou vhodné intervaly mezi endoskopiemi stále předmětem diskuse (Martinek J, Krajciova J., 2019). Přesto se zdá, že riziko recidivy je vyšší u pacientů s pokročilou vstupní histopatologickou diagnózou (např. karcinom) ve srovnání s pacienty s méně pokročilými stádii (např. LGD) (Krajciova J. et al., 2019) (Cotton CC. et al., 2018). Kontrolní endoskopie by tedy měly být dodržovány častěji u pacientů s AC a méně často u pacientů s iniciální diagnózou LGD. Kontrolní endoskopie sestává z pečlivé kontroly a z biopsií odebraných z jakékoli viditelné abnormality (léze, nové ostrůvky jazyků metaplastické sliznice), z neo-Z-linie a z jícnového neo-skvamózního epitelu (k vyloučení tzv. buried glands). V případech recidivy (viditelný segment BJ nebo neoplazie) je třeba zvážit další sezení endoskopické léčby. V případech perzistující/rekurentní IM v rámci makroskopicky normálně se objevující neo-Z linie není opakovaná léčba obvykle indikována (Krajciova J. et al., 2019) (Bajbouj M. et al., 2010) (Pouw RE. et al., 2008).

Konfokální laserová endomikroskopie je relativně nová metoda umožňující mikroskopické zobrazení v reálném čase. V současnosti dostupný systém pro pCLE umožňuje vyšetření celého trávicího systému, jelikož sondu lze zavést pracovním kanálem standardního endoskopu (jícen, žaludek, tlusté střevo) nebo cholangioskopu (žlučový strom, pankreatický vývod) nebo jehlou pro biopsii při endoskopické ultrasonografii. Konfokální laserová endomikroskopie může být užitečná buď jako doplňkový nástroj ke zvýšení diagnostické výtežnosti standardních diagnostických metod nebo jako nástroj umožňující náhradu (úplnou nebo částečnou) stávajících diagnostických metod.

Probe-based konfokální laserová endomikroskopie poskytuje spolehlivou diagnostiku IM u pacientů s BJ (Dunbar BK., 2013) (Sharma P. et al., 2011) (Kiesslich R. et al., 2006) a není horší než biopsie k vyloučení BORN (Bajbouj M. et al., 2010). Dvě studie u pacientů s BJ prokázaly, že použití pCLE může snížit počet biopsií potřebných k diagnostice neoplazie a že pCLE zlepšila detekci HGD/časného AC, pokud byla přidána k vysoko rozlišovací endoskopii s bílým světlem (HD-WLE, high-definition white light endoscopy) (Sharma P. et al., 2011) (Dunbar KB. et al., 2009). Kombinace narrow-band imaging, pCLE a HD-WLE vedla k vynikající senzitivě (100 %) pro diagnostiku HGD/AC (Sharma P. et al., 2011). U 60 % pacientů nebylo nutné odebrat biopsie. Naše nedávná studie ukázala, že pCLE je z hlediska diagnostické přesnosti přinejmenším stejně účinná jako standardní biopsie u pacientů s makroskopicky viditelnými lézemi jícnu/žaludku (projekt 3). Výhoda pCLE při hodnocení pacientů s BJ spočívá ve zlepšení diagnostické výtežnosti pro BORN a/nebo ve snížení počtu biopsií (u pacientů s viditelnou lézí jícnu může pCLE dokonce nahradit biopsie).

V této studii jsme zkoumali, zda by pCLE mohla být také užitečná u pacientů po úspěšné endoskopické léčbě BORN. Prokázali jsme, že pCLE může být v této indikaci užitečná, protože byla přinejmenším stejně účinná jako biopsie v detekci perzistující/recidivující IM a při vyloučení neoplazie. Mezi 20 pacienty s IM pCLE diagnostikovala všechny, zatímco biopsie vynechaly IM u 3 pacientů. Dosud pouze jedna randomizovaná studie hodnotila roli pCLE při hodnocení reziduálního BJ po endoskopické léčbě BORN. Sledovali, jestli použití pCLE v kombinaci s endoskopií s vysokým rozlišením mohlo zlepšit diagnostiku zbytkového BJ ve srovnání s endoskopií bez pCLE. Hlavním cílem byl podíl optimálně vedených pacientů (správně indikovaná další léčba u pacientů s reziduální IM/neoplázií a žádná terapie u pacientů bez IM/neoplázie). Studie dospěla k závěru, že přidání pCLE k endoskopii s vysokým rozlišením nepřispělo k lepší detekci reziduálního BJ nebo neoplazie (26 % pro endoskopii vs. 27 % pro endoskopii + pCLE) (Wallace MB. et al., 2012). Při porovnání jejich a naší studie však existuje několik rozdílů: za prvé jsme porovnávali pCLE s biopsiemi, ale netestovali jsme, zda by pCLE mohla zlepšit diagnostický výtěžek biopsií; za druhé, zahrnuli jsme pouze pacienty, kteří dokončili léčbu BORN; nakonec byla interpretace obrazu v naší studii provedena off-line po vyšetření a ne v reálném čase, což mohlo ovlivnit jejich záhyt intestinální metaplazie v pCLE.

Vzhledem k velmi nízkému počtu pacientů s recidivující neoplázií (1 pacient) jsme bohužel nemohli porovnat pCLE s biopsiemi při detekci recidivující neoplazie. Toto byl nejrelevantnější výstup z klinického hlediska. Nicméně s ohledem na velmi nízkou míru rekurentních neoplázií po ER/RFA (2–7 %) je studie srovnávající pCLE a biopsie v detekci rekurentní neoplazie pravděpodobně nereálná, protože by vyžadovala

zařazení vysokého počtu pacientů (např. s 2% mírou neoplastické recidivy by taková studie musela zahrnovat 1000 pacientů, aby bylo nalezeno 20 s recidivující neoplazií). Vzhledem k tomu, že pCLE spolehlivě diagnostikuje BORN u pacientů s BJ, můžeme předpokládat, že pCLE by také mohla spolehlivě diagnostikovat recidivující neoplazii. Je třeba poznamenat, že diagnóza (a následná re-RFA) jediného pacienta s recidivující LGD v naší studii byla založena pouze na pCLE, protože biopsie byly negativní.

Naše nálezy by mohly vyvolávat otázky o jejich klinickém významu a skutečného klinického dopadu perzistující/rekurentní IM v rámci normální neo-Z-linie. Odběr biopsií z normální neo-Z-linie se doporučoval během kontrolních endoskopií k detekci IM, vzhledem k tomu, že eradikace IM je považována za důležitý cíl endoskopické léčby BORN (Weusten B. et al., 2017) (Shaheen NJ. et al., 2009). Recentní práce publikovaná týmem z Holandska ukázala, že náhodné biopsie z normálně vyhlížející kardií prokázaly IM u 14 % a neoplazii u 0 % pacientů. IM v kardií byla v průběhu dalšího sledování pozorována ve 33 %, žádná však neprogredovala do neoplazie. Tato studie navrhuje mírnější intervaly kontrolních endoskopií s větším důrazem na pečlivou endoskopickou kontrolu, přičemž náhodné biopsie z neoskvamózního epitelu kardií mají spornou hodnotu (van Munster S. et al., 2022).

Na druhou stranu naše studie ukazuje, že pCLE je spolehlivá při vyloučení rekurentní neoplazie i tzv. buried glands pod neoskvamózním epitelem, jelikož pCLE neukázala žádný falešně pozitivní nález.

Naše studie také hodnotila, kolik žlázek a pohárkových buněk bylo vyšetřeno pomocí pCLE ve srovnání s biopsiemi u pacientů s IM. pCLE detekovala významně více pohárkových buněk ve srovnání s biopsiemi. Tento výsledek není příliš překvapivý, vezmeme-li v úvahu, že biopsie byly odebrány z 3-6 specifických míst v rámci neo-Z-linie, ale obrazy pCLE byly zaznamenány z celého obvodu neo-Z-linie. Můžeme tedy spekulovat, že pCLE by mohla mít vyšší pravděpodobnost detekce recidivujících neoplazií.

Hlavní nevýhodou pCLE je vysoká cena, která je výrazně vyšší ve srovnání s histopatologií (500 USD za pCLE vs. 150 USD za 5 biopsií) a bohužel pCLE není hrazena z veřejného pojištění.

Naše studie má určité nedostatky. Za prvé, byl zahrnutý pouze limitovaný počet pacientů a pouze jeden pacient měl recidivující neoplazii, která neumožňovala srovnání pCLE s biopsiemi v diagnostice rekurentní neoplazie. Off-line hodnocení obrazů pCLE lze také považovat za limitaci, protože možnost diagnostiky v reálném čase patří k zásadní výhodě pCLE.

7 HLAVNÍ ZÁVĚRY

7.1 1. PROJEKT

Endoskopická léčba se zdá být vhodnou alternativou k ezofagektomii i u pokročilejších karcinomů jícnu. Angioinvaze a lymfangioinvaze se jeví jako nejdůležitější prediktivní faktory postižení lymfatických uzlin a/nebo generalizace u časného karcinomu jícnu.

7.2 2. PROJEKT

Imunohistochemický průkaz p53 je vhodným markerem k odlišení dysplastických změn od reaktivních, ale není spolehlivý v odlišení low-grade a high-grade dysplazie. p53 mutovaný fenotyp nacházíme u nedysplastických, dysplastických změn i u karcinomu, což potvrzuje molekulárně-genetický podklad vzniku adenokarcinomu v terénu Barrettova jícnu.

7.3 3. PROJEKT

pCLE je srovnatelná se standardními biopsiemi z hlediska celkové diagnostické přesnosti v diagnostice lézí jícnu a žaludku. Na základě výsledků naší studie usuzujeme, že pCLE by mohla být uznána jako standardní metoda v diagnostice lézí jícnu a žaludku poskytující přesnou histopatologickou diagnostiku. pCLE navíc umožňuje pozorovat a hodnotit sliznici či léze i z dynamické stránky, jako je například rychlost proudění krve v cévách tumoru či ho porovnat s normální sliznicí.

7.4 4. PROJEKT

pCLE může být užitečná u pacientů podstupujících endoskopické sledování po terapii neoplázie asociované s Barrettovým jícnem (BORN), jelikož je srovnatelně přesná v diagnostice perzistující/recidivující IM a při vyloučení recidivující neoplázie jako standardní biopsie. Nespornou výhodou pCLE ve srovnání s biopsiemi je možnost vyšetření podstatně větší plochy.

8 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ ZABÝVAJÍCÍ SE NEMOCEMI JÍCNU

Publikace prvního projektu je v přípravě a bude odeslána k recenznímu řízení v nejbližší době.

První autor, periodikum s IF:

1. Kollar M, Krajciova J, Prefertusova L, Sticova E, Maluskova J, Vackova Z, Martinek J. Probe-based confocal laser endomicroscopy versus biopsies in the diagnostics of oesophageal and gastric lesions: A prospective, pathologist-blinded study. *United European Gastroenterol J.* 2020 May;8(4):436-443. doi: 10.1177/2050640620904865. Epub 2020 Jan 28. PMID: 32213027; PMCID: PMC7226690. **IF 4,623.**
2. Kollar M, Spicak J, Honsova E, Krajciova J, Vackova Z, Martinek J. Role of confocal laser endomicroscopy in patients with early esophageal neoplasia. *Minerva Chir.* 2018 Aug;73(4):417-427. doi: 10.23736/S0026-4733.18.07795-7. Epub 2018 May 25. PMID: 29806759. **IF 1,060.**

První autor, periodikum bez IF:

3. Kollár M, Krajčiová J, Husťák R, Malušková J, Kment M, Vacková Z, Špičák J, Martínek J. Confocal laser endomicroscopy in the diagnostics of gastrointestinal lesions literary review and personal experience. *Rozhl Chir.* 2018 Winter; 97(12):531-538. English. PMID: 30646731.
4. Kollár M, Malušková J, Krajčiová J et al. Kvalita biopsií u pacientů s Barrettovým jícnem – jumbo vs. large capacity kleště. *Gastroenterol Hepatol.* 2015; 69(5): 431-436. doi:10.14735/amgh2015431.

Spoluautor, periodikum s IF:

5. Krajciova J, Kollar M, Maluskova J, Janicko M, Vackova Z, Spicak J, Martinek J. Confocal Laser Endomicroscopy vs Biopsies in the Assessment of Persistent or Recurrent Intestinal Metaplasia/Neoplasia after Endoscopic Treatment of Barrett's Esophagus related Neoplasia. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2020 Sep 9;29(3):305-312. doi: 10.15403/jgld-2467. PMID: 32919414. **IF 2,142.**
6. Krajciova J, Janicko M, Falt P, Gregar J, Suchanek S, Ngo O, Kollar M, Urban O, Prochazka V, Zavoral M, Spicak J, Martinek J. Radiofrequency Ablation in Patients with Barrett's Esophagus- related Neoplasia - Long-Term Outcomes in the Czech National Database. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2019 Jun 1;28:149-155. doi: 10.15403/jgld-174. PMID: 31204400. **IF 2,142.**

7. Martinek J, Maluskova J, Stefanova M, Tuckova I, Suchanek S, Vackova Z, Krajciová J, Kollar M, Zavoral M, Spicak J. Improved specimen adequacy using jumbo biopsy forceps in patients with Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol*. 2015 May 7;21(17):5328-35. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5328. PMID: 25954107; PMCID: PMC4419074. **IF 5,28.**

8. Dolezel R, Ryska O, Kollar M, Juhasova J, Kalvach J, Ryska M, Martinek J. A comparison of two endoscopic closures: over-the-scope clip (OTSC) versus KING closure (endoloop + clips) in a randomized long-term experimental study. *Surg Endosc*. 2016 Nov;30(11):4910-4916. doi: 10.1007/s00464-016-4831-z. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26956361. **IF 4,584.**

Spoluautor, periodikum bez IF:

9. Martinek J, Dolezel R, Walterova B, Kollar M, Juhas S, Juhasova J, Vackova Z, Hustak R, Erben J. Stenting to prevent esophageal stricture after circumferential endoscopic submucosal dissection: an experimental study. *Endosc Int Open*. 2020 Nov;8(11):E1698-E1706. doi: 10.1055/a-1261-3103. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33140027; PMCID: PMC7581471.

10. Juhásová J, Klíma J, Martínek J, Walterová B, Dolezel R, Vacková Z, Kollár M, Juhas S. Two types of autologous cells in stricture development prevention after complete circular endoscopic dissection in mini-pig. *Rozhl Chir*. 2019 Winter;98(12):497-508. English. doi: 10.33699/PIS.2019.98.12.497-508. PMID: 31958964.

9 REFERENCE

- Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. 2018. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018 Jan;154(2):360-373. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.023. Epub 2017 Aug 18. Erratum in: *Gastroenterology*. 155(4):1281. PMID: 28823862; PMCID: PMC5836473.
- Abraham SC, Krasinskas AM, Correa AM, Hofstetter WL, Ajani JA, Swisher SG, Wu TT. 2007. Duplication of the muscularis mucosae in Barrett esophagus: an underrecognized feature and its implication for staging of adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 31(11):1719-25. doi: 10.1097/PAS.0b013e318093e3bf. PMID: 18059229.
- Abrahami D, McDonald EG, Schnitzer ME, Barkun AN, Suissa S, Azoulay L. 2022. Proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: population-based cohort study. *Gut*. 71(1):16-24. doi: 10.1136/gutjnl-2021-325097. Epub 2021 Jul 5. PMID: 34226290.
- American Society for Gastrointestinal Endoscopy (ASGE) Standards of Practice Committee, Anderson MA, Appalaneni V, Ben-Menachem T, Decker GA, Early DS, Evans JA, Fanelli RD, Fisher DA, Fisher LR, Fukami N, Hwang JH, Ikenberry SO, Jain R, Jue TL, Khan K, Krinsky ML, Malpas PM, Maple JT, Sharaf RN, Shergill AK, Dominitz JA, Cash BD. 2013. The role of endoscopy in the evaluation and treatment of patients with biliary neoplasia. *Gastrointest Endosc*. 77(2):167-74. doi: 10.1016/j.gie.2012.09.029. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23219047.
- Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. 2015. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut*. 64(3):381-7. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308124. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25320104.
- Asti E, Sozzi M, Bonitta G, Bernardi D, Bonavina L. 2018. Esophagectomy in patients with liver cirrhosis: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *J Visc Surg*. 155(6):453-464. doi: 10.1016/j.jviscsurg.2018.03.014. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29653854.
- Baba Y, Watanabe M, Baba H. 2013. Review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Today*. 43(12):1355-64. doi: 10.1007/s00595-012-0451-y. Epub 2013 Jan 5. PMID: 23291904.
- Badreddine RJ, Prasad GA, Lewis JT, Lutzke LS, Borkenhagen LS, Dunagan KT, Wang KK. 2010. Depth of submucosal invasion does not predict lymph node metastasis and survival of patients with esophageal carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 8(3):248-53. doi: 10.1016/j.cgh.2009.11.016. Epub 2009 Nov 27. PMID: 19948247; PMCID: PMC2834861.
- Bajbouj M, Vieth M, Rösch T, Miehke S, Becker V, Anders M, Pohl H, Madisch A, Schuster T, Schmid RM, Meining A. 2010. Probe-based confocal laser endomicroscopy compared with standard four-quadrant biopsy for evaluation of neoplasia in Barrett's esophagus. *Endoscopy*. 42(6):435-40. doi: 10.1055/s-0029-1244194. Epub 2010 May 26. PMID: 20506064.
- Barbera M, Fitzgerald RC. 2010. Cellular origin of Barrett's metaplasia and oesophageal stem cells. *Biochem Soc Trans*. 38(2):370-3. doi: 10.1042/BST0380370. PMID: 20298185.

BARRETT NR. 1950. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg*. 38(150):175-82. doi: 10.1002/bjs.18003815005. PMID: 14791960.

Belykh E, Zhao X, Ngo B, Farhadi DS, Byvaltsev VA, Eschbacher JM, Nakaji P, Preul MC. 2020. Intraoperative Confocal Laser Endomicroscopy *Ex Vivo* Examination of Tissue Microstructure During Fluorescence-Guided Brain Tumor Surgery. *Front Oncol*. 10:599250. doi: 10.3389/fonc.2020.599250. PMID: 33344251; PMCID: PMC7746822.

Bennett C, Vakil N, Bergman J, Harrison R, Odze R, Vieth M, Sanders S, Gay L, Pech O, Longcroft-Wheaton G, Romero Y, Inadomi J, Tack J, Corley DA, Manner H, Green S, Al Dulaimi D, Ali H, Allum B, Anderson M, Curtis H, Falk G, Fennerty MB, Fullarton G, Krishnadath K, Meltzer SJ, Armstrong D, Ganz R, Cengia G, Going JJ, Goldblum J, Gordon C, Grabsch H, Haigh C, Hongo M, Johnston D, Forbes-Young R, Kay E, Kaye P, Lerut T, Lovat LB, Lundell L, Mairs P, Shimoda T, Spechler S, Sontag S, Malfertheiner P, Murray I, Nanji M, Poller D, Ragnath K, Regula J, Cestari R, Shepherd N, Singh R, Stein HJ, Talley NJ, Galmiche JP, Tham TC, Watson P, Yeran L, Rugge M, Rice TW, Hart J, Gittens S, Hewin D, Hochberger J, Kahrilas P, Preston S, Sampliner R, Sharma P, Stuart R, Wang K, Waxman I, Abley C, Loft D, Penman I, Shaheen NJ, Chak A, Davies G, Dunn L, Falck-Ytter Y, DeCaestecker J, Bhandari P, Ell C, Griffin SM, Attwood S, Barr H, Allen J, Ferguson MK, Moayyedi P, Jankowski JA. 2012. Consensus statements for management of Barrett's dysplasia and early-stage esophageal adenocarcinoma, based on a Delphi process. *Gastroenterology*. 143(2):336-46. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.032. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22537613; PMCID: PMC5538857.

Bertani H, Frazzoni M, Dabizzi E, Pigò F, Losi L, Manno M, Manta R, Bassotti G, Conigliaro R. 2013. Improved detection of incident dysplasia by probe-based confocal laser endomicroscopy in a Barrett's esophagus surveillance program. *Dig Dis Sci*. 58(1):188-93. doi: 10.1007/s10620-012-2332-z. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22875309.

Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, Murray LJ. 2011. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst*. 103(13):1049-57. doi: 10.1093/jnci/djr203. Epub 2011 Jun 16. Erratum in: *J Natl Cancer Inst*. 2013 Apr 17;105(8):581. PMID: 21680910; PMCID: PMC3632011.

Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. 1994. *Semin Oncol*. 21(4):403-10. PMID: 8042037.

Boerwinkel DF, Holz JA, Kara MA, Meijer SL, Wallace MB, Wong Kee Song LM, Ragnath K, Wolfsen HC, Iyer PG, Wang KK, Weusten BL, Aalders MC, Curvers WL, Bergman JJ. 2014. Effects of autofluorescence imaging on detection and treatment of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 12(5):774-81. doi: 10.1016/j.cgh.2013.10.013. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24161353.

Bosch A, Frias Z, Caldwell WL. 1979. Adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer*. 43(4):1557-61. doi: 10.1002/1097-0142(197904)43:4<1557::aid-cncr2820430450>3.0.co;2-l. PMID: 445351.

Bouma BE, Tearney GJ, Compton CC, Nishioka NS. 2000. High-resolution imaging of the human esophagus and stomach in vivo using optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc*. 51(4 Pt 1):467-74. doi: 10.1016/s0016-5107(00)70449-4. PMID: 10744824.

Boys JA, Worrell SG, Chandrasoma P, Vallone JG, Maru DM, Zhang L, Blackmon SH, Dickinson KJ, Dunst CM, Hofstetter WL, Lada MJ, Louie BE, Molena D, Watson TJ, DeMeester SR. 2016. Can the Risk of Lymph Node Metastases Be Gauged in Endoscopically Resected Submucosal Esophageal

- Adenocarcinomas? A Multi-Center Study. *J Gastrointest Surg.* 20(1):6-12; discussion 12. doi: 10.1007/s11605-015-2950-9. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26408330.
- Brand S, Poneros JM, Bouma BE, Tearney GJ, Compton CC, Nishioka NS. 2000. Optical coherence tomography in the gastrointestinal tract. *Endoscopy.* 32(10):796-803. doi: 10.1055/s-2000-7714. PMID: 11068841.
- Brugge WR, Lewandrowski K, Lee-Lewandrowski E, Centeno BA, Szydlo T, Regan S, del Castillo CF, Warshaw AL. 2004. Diagnosis of pancreatic cystic neoplasms: a report of the cooperative pancreatic cyst study. *Gastroenterology.* 126(5):1330-6. doi: 10.1053/j.gastro.2004.02.013. PMID: 15131794.
- Chandrasoma P, Wijetunge S, DeMeester S, Ma Y, Hagen J, Zamis L, DeMeester T. 2012. Columnar-lined esophagus without intestinal metaplasia has no proven risk of adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 36(1):1-7. doi: 10.1097/PAS.0b013e31822a5a2c. PMID: 21959311.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu XQ, He J. 2016. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin.* 66(2):115-32. doi: 10.3322/caac.21338. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26808342.
- Cheng SJ, Sala M, Li MH, Chouroulinkov I. 1982. Esophageal cancer in Linxian county, China: a possible etiology and mechanism (initiation and promotion). *Carcinog Compr Surv.* 7:167-74. PMID: 7066917.
- Cook MB, Chow WH, Devesa SS. 2009. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *Br J Cancer.* 101(5):855-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605246. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19672254; PMCID: PMC2736840.
- Cotton CC, Haidry R, Thrift AP, Lovat L, Shaheen NJ. 2018. Development of Evidence-Based Surveillance Intervals After Radiofrequency Ablation of Barrett's Esophagus. *Gastroenterology.* 155(2):316-326.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2018.04.011. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29655833; PMCID: PMC6067977.
- Curvers WL, ten Kate FJ, Krishnadath KK, Visser M, Elzer B, Baak LC, Bohmer C, Mallant-Hent RC, van Oijen A, Naber AH, Scholten P, Busch OR, Blaauwgeers HG, Meijer GA, Bergman JJ. 2010. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: overdiagnosed and underestimated. *Am J Gastroenterol.* 105(7):1523-30. doi: 10.1038/ajg.2010.171. Epub 2010 May 11. PMID: 20461069.
- Čihák R. 2022. *Anatomie 2. Třetí, upravené a doplněné vydání.* Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4788-0.
- Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. 1998. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer.* 15;83(10):2049-53. PMID: 9827707.
- Duits LC, Phoa KN, Curvers WL, Ten Kate FJ, Meijer GA, Seldenrijk CA, Offerhaus GJ, Visser M, Meijer SL, Krishnadath KK, Tijssen JG, Mallant-Hent RC, Bergman JJ. 2015. Barrett's oesophagus patients with low-grade dysplasia can be accurately risk-stratified after histological review by an expert pathology panel. *Gut.* 64(5):700-6. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307278. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25034523.
- Dunbar KB. Endomicroscopy in Barrett's esophagus. 2013. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 23(3):565-79. doi: 10.1016/j.giec.2013.03.003. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23735103.

Dunbar KB, Canto MI. 2010. Confocal laser endomicroscopy in Barrett's esophagus and endoscopically inapparent Barrett's neoplasia: a prospective, randomized, double-blind, controlled, crossover trial. *Gastrointest Endosc.* 72(3):668. doi: 10.1016/j.gie.2009.12.007. PMID: 20801292.

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL, Schoenberg JB, Mayne ST, Dubrow R, Rotterdam H, West AB, Blaser M, Blot WJ, Gail MH, Fraumeni JF Jr. 2003. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst.* 95(18):1404-13. doi: 10.1093/jnci/djg047. PMID: 13130116.

Finks JF, Osborne NH, Birkmeyer JD. 2011. Trends in hospital volume and operative mortality for high-risk surgery. *N Engl J Med.* 364(22):2128-37. doi: 10.1056/NEJMsa1010705. PMID: 21631325; PMCID: PMC3150488.

Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragnath K, Ang Y, Kang JY, Watson P, Trudgill N, Patel P, Kaye PV, Sanders S, O'Donovan M, Bird-Lieberman E, Bhandari P, Jankowski JA, Attwood S, Parsons SL, Loft D, Lagergren J, Moayyedi P, Lyratzopoulos G, de Caestecker J; British Society of Gastroenterology. 2014. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut.* 63(1):7-42. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305372. Epub 2013 Oct 28. PMID: 24165758.

Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. 1997. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med.* 3(1):5-20. PMID: 9132280; PMCID: PMC2230107.

Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, Schubert J, Vieth M, Neurath MF. 2013. Confocal laser endomicroscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *Eur Respir J.* 41(6):1401-8. doi: 10.1183/09031936.00062512. Epub 2012 Sep 20. PMID: 22997220.

Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, Frieser M, Ganslmayer M, Schwarz S, Uder M, Neurath MF. 2011. Fluorescein-aided confocal laser endomicroscopy of the lung. *Respiration.* 81(1):32-8. doi: 10.1159/000320365. Epub 2010 Aug 21. PMID: 20733287.

Glickman JN, Chen YY, Wang HH, Antonioli DA, Odze RD. 2001. Phenotypic characteristics of a distinctive multilayered epithelium suggests that it is a precursor in the development of Barrett's esophagus. *Am J Surg Pathol.* 25(5):569-78. doi: 10.1097/00000478-200105000-00002. PMID: 11342767.

Gockel I, Exner C, Junginger T. 2005. Morbidity and mortality after esophagectomy for esophageal carcinoma: a risk analysis. *World J Surg Oncol.* 3:37. doi: 10.1186/1477-7819-3-37. PMID: 15969746; PMCID: PMC1168909.

Guo J, Li CQ, Li M, Zuo XL, Yu T, Liu JW, Liu J, Kou GJ, Li YQ. 2015. Diagnostic value of probe-based confocal laser endomicroscopy and high-definition virtual chromoendoscopy in early esophageal squamous neoplasia. *Gastrointest Endosc.* 81(6):1346-54. doi: 10.1016/j.gie.2014.10.041. Epub 2015 Feb 10. PMID: 25680899.

Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. 2004. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther.* 3(7):593-601. doi: 10.4161/cbt.3.7.913. Epub 2004 Jul 9. PMID: 15136761.

Guo YT, Li YQ, Yu T, Zhang TG, Zhang JN, Liu H, Liu FG, Xie XJ, Zhu Q, Zhao YA. 2008. Diagnosis of gastric intestinal metaplasia with confocal laser endomicroscopy in vivo: a prospective study. *Endoscopy.* 40(7):547-53. doi: 10.1055/s-2007-995633. PMID: 18618938.

Hadravská S, Chlumská A, Boudová L, Mukensnabl P, Sulc M. 2004. The histological findings in the gastroesophageal junction of fetuses. *Cesk Patol.* 40(1):7-10. PMID: 15035053.

Haidry RJ, Dunn JM, Butt MA, Burnell MG, Gupta A, Green S, Miah H, Smart HL, Bhandari P, Smith LA, Willert R, Fullarton G, Morris J, Di Pietro M, Gordon C, Penman I, Barr H, Patel P, Boger P, Kapoor N, Mahon B, Hoare J, Narayanasamy R, O'Toole D, Cheong E, Direkze NC, Ang Y, Novelli M, Banks MR, Lovat LB. 2013. Radiofrequency ablation and endoscopic mucosal resection for dysplastic barrett's esophagus and early esophageal adenocarcinoma: outcomes of the UK National Halo RFA Registry. *Gastroenterology.* 145(1):87-95. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.045. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23542069.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840. PMID: 1905840.

Huang J, Yang YS, Lu ZS, Wang SF, Yang J, Yuan J. 2015. Detection of superficial esophageal squamous cell neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. *World J Gastroenterol.* 21(22):6974-81. doi: 10.3748/wjg.v21.i22.6974. PMID: 26078575; PMCID: PMC4462739.

Huo X, Zhang HY, Zhang XI, Lynch JP, Strauch ED, Wang JY, Melton SD, Genta RM, Wang DH, Spechler SJ, Souza RF. 2010. Acid and bile salt-induced CDX2 expression differs in esophageal squamous cells from patients with and without Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 139(1):194-203.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.035. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20303354; PMCID: PMC2902607.

Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P. 2011. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med.* 365(15):1375-83. doi: 10.1056/NEJMoa1103042. PMID: 21995385.

Islami F, Kamangar F, Aghcheli K, Fahimi S, Semnani S, Taghavi N, Marjani HA, Merat S, Nasseri-Moghaddam S, Pourshams A, Nouraie M, Khatibian M, Abedi B, Brazandeh MH, Ghaziani R, Sotoudeh M, Dawsey SM, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R. 2004. Epidemiologic features of upper gastrointestinal tract cancers in Northeastern Iran. *Br J Cancer.* 90(7):1402-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601737. PMID: 15054463; PMCID: PMC2409685.

Januszewicz W, Pilonis ND, Sawas T, Phillips R, O'Donovan M, Miremadi A, Malhotra S, Tripathi M, Blasko A, Katzka DA, Fitzgerald RC, di Pietro M. 2022. The utility of P53 immunohistochemistry in the diagnosis of Barrett's oesophagus with indefinite for dysplasia. *Histopathology.* 80(7):1081-1090. doi: 10.1111/his.14642. PMID: 35274753; PMCID: PMC9321087.

Kalabis J, Oyama K, Okawa T, Nakagawa H, Michaylira CZ, Stairs DB, Figueiredo JL, Mahmood U, Diehl JA, Herlyn M, Rustgi AK. 2008. A subpopulation of mouse esophageal basal cells has properties of stem cells with the capacity for self-renewal and lineage specification. *J Clin Invest.* 118(12):3860-9. doi: 10.1172/JCI35012. Epub 2008 Nov 6. PMID: 19033657; PMCID: PMC2579884.

Kambhampati S, Tieu AH, Lubber B, Wang H, Meltzer SJ. 2020. Risk Factors for Progression of Barrett's Esophagus to High Grade Dysplasia and Esophageal Adenocarcinoma. *Sci Rep.* 10(1):4899. doi: 10.1038/s41598-020-61874-7. PMID: 32184470; PMCID: PMC7078316.

Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, Stoop HA, Walter L, Kuipers EJ, Spaander MC, Bruno MJ; 2013. ProBar-study group. Aberrant p53 protein expression is associated

with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*. 62(12):1676-83. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303594. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23256952.

Kauttu TM, Rantanen TK, Sihvo EI, Räsänen JV, Puolakkainen P, Salo JA. 2011. Esophageal adenocarcinoma arising after antireflux surgery: a population-based analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 40(6):1450-4; discussion 1454. doi: 10.1016/j.ejcts.2011.02.075. Epub 2011 May 4. PMID: 21546258.

Kaye PV, Ilyas M, Soomro I, Haider SA, Atwal G, Menon S, Gill S, Richards C, Harrison R, West K, Rangunath K. 2016. Dysplasia in Barrett's oesophagus: p53 immunostaining is more reproducible than haematoxylin and eosin diagnosis and improves overall reliability, while grading is poorly reproducible. *Histopathology*. 69(3):431-40. doi: 10.1111/his.12956. Epub 2016 Apr 6. PMID: 26918780.

Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. 2004. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 127(3):706-13. doi: 10.1053/j.gastro.2004.06.050. PMID: 15362025.

Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. 2006. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 4(8):979-87. doi: 10.1016/j.cgh.2006.05.010. Epub 2006 Jul 13. PMID: 16843068.

Kohli DR, Schubert ML, Zfass AM, Shah TU. 2017. Performance characteristics of optical coherence tomography in assessment of Barrett's esophagus and esophageal cancer: systematic review. *Dis Esophagus*. 30(11):1-8. doi: 10.1093/dote/dox049. PMID: 28881898.

Kohoutova D, Haidry R, Banks M, Bown S, Sehgal V, Butt MA, Graham D, Thorpe S, Novelli M, Rodriguez-Justo M, Lovat L. 2015. Esophageal neoplasia arising from subsquamous buried glands after an apparently successful photodynamic therapy or radiofrequency ablation for Barrett's associated neoplasia. *Scand J Gastroenterol*. 50(11):1315-21. doi: 10.3109/00365521.2015.1043578. Epub 2015 May 8. PMID: 25956748.

Kollar M, Krajciová J, Prefertusová L, Sticová E, Malusková J, Vacková Z, Martinek J. 2020. Probe-based confocal laser endomicroscopy versus biopsies in the diagnostics of oesophageal and gastric lesions: A prospective, pathologist-blinded study. *United European Gastroenterol J*. 8(4):436-443. doi: 10.1177/2050640620904865. Epub 2020 Jan 28. PMID: 32213027; PMCID: PMC7226690.

Kollar M, Krajciová J, Hustak R, Malusková J, Kment M, Vacková Z, Spicak J, Martinek J. 2018. Confocal laser endomicroscopy in the diagnostics of gastrointestinal lesions literary review and personal experience. *Rozhl Chir*. 97(12):531-538. English. PMID: 30646731.

Kong J, Crissey MA, Funakoshi S, Kreindler JL, Lynch JP. 2011. Ectopic Cdx2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus. *PLoS One*. 6(4):e18280. doi: 10.1371/journal.pone.0018280. PMID: 21494671; PMCID: PMC3071814.

Kopacova M, Rejchrt S, Tycova V, Tachei I, Ryska A, Bures J. 2007. Confocal laser scanning endomicroscopy. Initial experience in the Czech Republic. *Folia Gastroenterol Hepatol*. 5(3-4):20-31.

- Kopacova M, Bures J, Osterreicher J, Kvetina J, Pejchal J, Tacheci I, Kunes M, Spelda S, Rejchrt S. 2009. Konfokální laserová endomikroskopie u experimentálního prasete. Metodika ex vivo zobrazení. *Cas Lek Cesk.* 148:249-53.
- Krajciova J, Janicko M, Falt P, Gregar J, Suchanek S, Ngo O, Kollar M, Urban O, Prochazka V, Zavoral M, Spicak J, Martinek J. 2019. Radiofrequency Ablation in Patients with Barrett's Esophagus- related Neoplasia - Long-Term Outcomes in the Czech National Database. *J Gastrointestin Liver Dis.* 28:149-155. doi: 10.15403/jgld-174. PMID: 31204400.
- Köbel M, Kang EY. 2021. The Many Uses of p53 Immunohistochemistry in Gynecological Pathology: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol.* 40(1):32-40. doi: 10.1097/PGP.0000000000000725. PMID: 33290354.
- Lavery DL, Martinez P, Gay LJ, Cereser B, Novelli MR, Rodriguez-Justo M, Meijer SL, Graham TA, McDonald SA, Wright NA, Jansen M. 2021. Evolution of oesophageal adenocarcinoma from metaplastic columnar epithelium without goblet cells in Barrett's oesophagus. *Gut.* 65(6):907-13. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310748. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26701877; PMCID: PMC4893117.
- Leedham SJ, Preston SL, McDonald SA, Elia G, Bhandari P, Poller D, Harrison R, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA. 2008. Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus. *Gut.* 57(8):1041-8. doi: 10.1136/gut.2007.143339. Epub 2008 Feb 27. PMID: 18305067; PMCID: PMC2564832.
- Levine AJ, Oren M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 9(10):749-58. doi: 10.1038/nrc2723. PMID: 19776744; PMCID: PMC2771725.
- Li WB, Zuo XL, Li CQ, Zuo F, Gu XM, Yu T, Chu CL, Zhang TG, Li YQ. 2011. Diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric superficial cancerous lesions. *Gut.* 60(3):299-306. doi: 10.1136/gut.2010.223586. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21193460.
- Li Z, Zuo XL, Yu T, Gu XM, Zhou CJ, Li CQ, Ji R, Li YQ. 2014. Confocal laser endomicroscopy for in vivo detection of gastric intestinal metaplasia: a randomized controlled trial. *Endoscopy.* 46(4):282-90. doi: 10.1055/s-0033-1359215. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24473908.
- Lim LG, Yeoh KG, Srivastava S, Chan YH, Teh M, Ho KY. 2013. Comparison of probe-based confocal endomicroscopy with virtual chromoendoscopy and white-light endoscopy for diagnosis of gastric intestinal metaplasia. *Surg Endosc.* 27(12):4649-55. doi: 10.1007/s00464-013-3098-x. Epub 2013 Jul 27. PMID: 23892761.
- Liu T, Zhang X, So CK, Wang S, Wang P, Yan L, Myers R, Chen Z, Patterson AP, Yang CS, Chen X. 2007. Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 28(2):488-96. doi: 10.1093/carcin/bgl176. Epub 2006 Sep 21. PMID: 16990345.
- Longcroft-Wheaton G, Brown J, Basford P, Cowlshaw D, Higgins B, Bhandari P. 2013. Duration of acetowhitening as a novel objective tool for diagnosing high risk neoplasia in Barrett's esophagus: a prospective cohort trial. *Endoscopy.* 45(6):426-32. doi: 10.1055/s-0032-1326630. Epub 2013 Jun 3. PMID: 23733726.

- Maes S, Haidry R, Bisschops R. 2018. Can the depth of invasion of early esophageal cancer be predicted based on endoscopic evidence? *Minerva Chir.* 73(4):385-393. doi: 10.23736/S0026-4733.18.07760-X. Epub 2018 May 24. PMID: 29795069.
- Manner H, Pech O, Heldmann Y, May A, Pohl J, Behrens A, Gossner L, Stolte M, Vieth M, Ell C. 2013. Efficacy, safety, and long-term results of endoscopic treatment for early stage adenocarcinoma of the esophagus with low-risk sm1 invasion. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(6):630-5; quiz e45. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.040. Epub 2013 Jan 26. PMID: 23357492.
- Martinek J, Krajciova J. 2019. Barrett's: Does radiofrequency ablation reduce the need for a follow-up? *Endosc Int Open.* 7(11):E1483-E1486. doi: 10.1055/a-0996-8336. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31673621; PMCID: PMC6811347.
- Martinek J, Benes M, Brandtl P, Hucl T, Vasicek M, Voska L, Lanska V, Nosek V, Spicak J. 2008. Low incidence of adenocarcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia in patients with Barrett's esophagus: a prospective cohort study. *Endoscopy.* 40(9):711-6. doi: 10.1055/s-2008-1077502. Epub 2008 Aug 12. PMID: 18698534.
- Martinek J, Falt P, Gregar J, Prochazka V, Spicak J, Urban O, Rejchrt S, Pazdro A, Zemanova M, Hep A, Maluskova J, Stefanova M, Vieth M, Jirasek T, Hucl T. 2013. Guidelines of the Czech gastroenterological society - Endoscopic treatment of Barrett's esophagus and early esophageal neoplasia. *Gastroent Hepatol.* 67(6):479-489.
- Mařatka Z. 1964. *Praktická gastroenterologie*. První vydání. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství.
- Na HK, Lee JY. 2017. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *Int J Mol Sci.* 18(6):1116. doi: 10.3390/ijms18061116. PMID: 28538665; PMCID: PMC5485940.
- Nakai Y, Iwashita T, Park DH, Samarasena JB, Lee JG, Chang KJ. 2015. Diagnosis of pancreatic cysts: EUS-guided, through-the-needle confocal laser-induced endomicroscopy and cystoscopy trial: DETECT study. *Gastrointest Endosc.* 81(5):1204-14. doi: 10.1016/j.gie.2014.10.025. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25634486.
- Napoleon B, Lemaistre AI, Pujol B, Caillol F, Lucidarme D, Bourdariat R, Morellon-Mialhe B, Fumex F, Lefort C, Lepilliez V, Palazzo L, Monges G, Filoche B, Giovannini M. 2015. A novel approach to the diagnosis of pancreatic serous cystadenoma: needle-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy.* 47(1):26-32. doi: 10.1055/s-0034-1390693. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25325684.
- Nason KS, Wichienkuer PP, Awais O, Schuchert MJ, Luketich JD, O'Rourke RW, Hunter JG, Morris CD, Jobe BA. 2011. Gastroesophageal reflux disease symptom severity, proton pump inhibitor use, and esophageal carcinogenesis. *Arch Surg.* 146(7):851-8. doi: 10.1001/archsurg.2011.174. PMID: 21768433; PMCID: PMC4086744.
- Nentwich MF, von Loga K, Reeh M, Uzunoglu FG, Marx A, Izbicki JR, Bogoevski D. 2014. Depth of submucosal tumor infiltration and its relevance in lymphatic metastasis formation for T1b squamous cell and adenocarcinomas of the esophagus. *J Gastrointest Surg.* 18(2):242-9; discussion 249. doi: 10.1007/s11605-013-2367-2. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24091912.

- Newton RC, Kemp SV, Yang GZ, Elson DS, Darzi A, Shah PL. 2012. Imaging parenchymal lung diseases with confocal endomicroscopy. *Respir Med.* 106(1):127-37. doi: 10.1016/j.rmed.2011.09.009. Epub 2011 Oct 14. PMID: 22000588.
- Odze RD. 2005. Unraveling the mystery of the gastroesophageal junction: a pathologist's perspective. *Am J Gastroenterol.* 100(8):1853-67. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.50096.x. PMID: 16144130.
- Orman ES, Li N, Shaheen NJ. 2013. Efficacy and durability of radiofrequency ablation for Barrett's Esophagus: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(10):1245-55. doi: 10.1016/j.cgh.2013.03.039. Epub 2013 May 2. PMID: 23644385; PMCID: PMC3870150.
- Pailoor K, Sarpangala M, Naik R. 2013. Histopathological diagnosis of gastric biopsies in correlation with endoscopy – a study in a tertiary care center. *Ady Lab Med Int.* 22-31.
- Park YS, Park HJ, Kang GH, Kim CJ, Chi JG. 2003. Histology of gastroesophageal junction in fetal and pediatric autopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 127(4):451-5. doi: 10.5858/2003-127-0451-HOGJIF. PMID: 12683873.
- Parkin DM, Läärä E, Muir CS. 1988. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer.* 41(2):184-97. doi: 10.1002/ijc.2910410205. PMID: 3338870.
- Pech O, Rabenstein T, Manner H, Petrone MC, Pohl J, Vieth M, Stolte M, Ell C. 2008. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 6(1):89-94. doi: 10.1016/j.cgh.2007.10.013. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18063417.
- Peng D, Hu T, Soutto M, Belkhiri A, Zaika A, El-Rifai W. 2014. Glutathione peroxidase 7 has potential tumour suppressor functions that are silenced by location-specific methylation in oesophageal adenocarcinoma. *Gut.* 63(4):540-51. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304612. Epub 2013 Apr 12. PMID: 23580780; PMCID: PMC3825783.
- Peppelenbosch MP, Spaander MC, Bruno MJ. 2014. Glutathione peroxidase 7 prevents cancer in the oesophagus. *Gut.* 63(4):537-8. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304906. Epub 2013 Jun 29. PMID: 23812405.
- Phoa KN, Pouw RE, Bisschops R, Pech O, Ragnath K, Weusten BL, Schumacher B, Rembacken B, Meining A, Messmann H, Schoon EJ, Gossner L, Mannath J, Seldenrijk CA, Visser M, Lerut T, Seewald S, ten Kate FJ, Ell C, Neuhaus H, Bergman JJ. 2016. Multimodality endoscopic eradication for neoplastic Barrett oesophagus: results of an European multicentre study (EURO-II). *Gut.* 65(4):555-62. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309298. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25731874.
- Pimentel-Nunes P, Libânio D, Bastiaansen BAJ, Bhandari P, Bisschops R, Bourke MJ, Esposito G, Lemmers A, Maselli R, Messmann H, Pech O, Pioche M, Vieth M, Weusten BLAM, van Hooft JE, Deprez PH, Dinis-Ribeiro M. 2022. Endoscopic submucosal dissection for superficial gastrointestinal lesions: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2022. *Endoscopy.* 54(6):591-622. doi: 10.1055/a-1811-7025. Epub 2022 May 6. PMID: 35523224.
- Pohl H, Rösch T, Vieth M, Koch M, Becker V, Anders M, Khalifa AC, Meining A. 2008. Miniprobe confocal laser microscopy for the detection of invisible neoplasia in patients with Barrett's oesophagus. *Gut.* 57(12):1648-53. doi: 10.1136/gut.2008.157461. Epub 2008 Aug 28. PMID: 18755886.

Pouw RE, Gondrie JJ, Sondermeijer CM, ten Kate FJ, van Gulik TM, Krishnadath KK, Fockens P, Weusten BL, Bergman JJ. 2008. Eradication of Barrett esophagus with early neoplasia by radiofrequency ablation, with or without endoscopic resection. *J Gastrointest Surg.* 12(10):1627-36; discussion 1636-7. doi: 10.1007/s11605-008-0629-1. Epub 2008 Aug 13. PMID: 18704598.

Prabhu A, Obi KO, Rubenstein JH. 2014. The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 109(6):822-7. doi: 10.1038/ajg.2014.71. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24751582.

Qi X, Sivak MV, Isenberg G, Willis JE, Rollins AM. 2006. Computer-aided diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus using endoscopic optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 11(4):044010. doi: 10.1117/1.2337314. PMID: 16965167.

Rastogi A, Puli S, El-Serag HB, Bansal A, Wani S, Sharma P. 2008. Incidence of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus and high-grade dysplasia: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 67(3):394-8. doi: 10.1016/j.gie.2007.07.019. Epub 2007 Nov 28. PMID: 18045592.

Redston M, Noffsinger A, Kim A, Akarca FG, Rara M, Stapleton D, Nowden L, Lash R, Bass AJ, Stachler MD. 2022. Abnormal TP53 Predicts Risk of Progression in Patients With Barrett's Esophagus Regardless of a Diagnosis of Dysplasia. *Gastroenterology.* 162(2):468-481. doi: 10.1053/j.gastro.2021.10.038. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34757142; PMCID: PMC9341495.

Rice TW, Zuccaro G Jr, Adelstein DJ, Rybicki LA, Blackstone EH, Goldblum JR. 1998. Esophageal carcinoma: depth of tumor invasion is predictive of regional lymph node status. *Ann Thorac Surg.* 65(3):787-92. doi: 10.1016/s0003-4975(97)01387-8. PMID: 9527214.

Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. 2003. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40(2):183-208. doi: 10.1080/713609333. PMID: 12755455.

Salo JA, Sihvo E. 2003. Is there immunocytochemical evidence to support origin of Barrett's epithelium from adjacent squamous epithelium? In: Giuli R. Barrett's esophagus. *John Lingey Eurotext.* Paris. 42-55.

Sarosi G, Brown G, Jaiswal K, Feagins LA, Lee E, Crook TW, Souza RF, Zou YS, Shay JW, Spechler SJ. 2008. Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus.* 21(1):43-50. doi: 10.1111/j.1442-2050.2007.00744.x. PMID: 18197938.

Seichert V, Šramhauser J. 1963. Arteriální zásobení jícnu. *Československá morfologie.* 11(3):221-228.

Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB; American College of Gastroenterology. 2016. ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol.* 111(1):30-50; quiz 51. doi: 10.1038/ajg.2015.322. Epub 2015 Nov 3. Erratum in: *Am J Gastroenterol.* 2016; 111(7):1077. PMID: 26526079.

Sharma P, Meining AR, Coron E, Lightdale CJ, Wolfsen HC, Bansal A, Bajbouj M, Galmiche JP, Abrams JA, Rastogi A, Gupta N, Michalek JE, Lauwers GY, Wallace MB. 2011. Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: final results of an international multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 74(3):465-72. doi: 10.1016/j.gie.2011.04.004. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21741642; PMCID: PMC3629729.

- Sharma P, Savides TJ, Canto MI, Corley DA, Falk GW, Goldblum JR, Wang KK, Wallace MB, Wolfsen HC; ASGE Technology and Standards of Practice Committee. 2012. The American Society for Gastrointestinal Endoscopy PIVI (Preservation and Incorporation of Valuable Endoscopic Innovations) on imaging in Barrett's Esophagus. *Gastrointest Endosc.* 76(2):252-4. doi: 10.1016/j.gie.2012.05.007. PMID: 22817781.
- Siddiqi M, Tricker AR, Preussmann R. 1988. The occurrence of preformed N-nitroso compounds in food samples from a high risk area of esophageal cancer in Kashmir, India. *Cancer Lett.* 39(1):37-43. doi: 10.1016/0304-3835(88)90038-9. PMID: 3345506.
- Sivak MV Jr, Kobayashi K, Izatt JA, Rollins AM, Ung-Runyawee R, Chak A, Wong RC, Isenberg GA, Willis J. 2000. High-resolution endoscopic imaging of the GI tract using optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc.* 51(4 Pt 1):474-9. doi: 10.1016/s0016-5107(00)70450-0. PMID: 10744825.
- American Gastroenterological Association, Spechler SJ, Sharma P, Souza RF, Inadomi JM, Shaheen NJ. 2011. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 140(3):1084-91. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.030. PMID: 21376940.
- Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, Goyal RK, Hirano I, Ramirez F, Raufman JP, Sampliner R, Schnell T, Sontag S, Vlahcevic ZR, Young R, Williford W. 2001. Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA.* 285(18):2331-8. doi: 10.1001/jama.285.18.2331. PMID: 11343480.
- Špičák J. et al. 2015. *Novinky v digestivní endoskopii*. První vydání. Praha: Grada, 2015. 23-71.
- Steevens J, Botterweck AA, Dirx MJ, van den Brandt PA, Schouten LJ. 2010. Trends in incidence of oesophageal and stomach cancer subtypes in Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 22(6):669-78. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832ca091. PMID: 19474750.
- Stefanova M, Tuckova I, Maluskova J, Kollar M, Spicak J, Martinek J. 2013. Biopsie nejsou dostatečně pro přesnou diagnostiku neoplazie u pacientů s Barrettovým jícnem. *Gastroenterol Hepatol.* 67(4):264-70.
- Stefanova M, Zavoral M, Zavada F, Suchanek S, Martinek J. 2011. Přínos autofluorescence v diagnostice lehké intraepiteliální neoplazie u pacientů s Barrettovým jícnem. *Gastroenterol Hepatol.* 65(5): 249-254.
- Su H, Hu N, Shih J, Hu Y, Wang QH, Chuang EY, Roth MJ, Wang C, Goldstein AM, Ding T, Dawsey SM, Giffen C, Emmert-Buck MR, Taylor PR. 2003. Gene expression analysis of esophageal squamous cell carcinoma reveals consistent molecular profiles related to a family history of upper gastrointestinal cancer. *Cancer Res.* 63(14):3872-6. PMID: 12873975.
- Sugimachi K, Ikebe M, Kitamura K, Toh Y, Matsuda H, Kuwano H. 1993. Long-term results of esophagectomy for early esophageal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 40(3):203-6. PMID: 8325583.
- Titi M, Overhiser A, Ulusarac O, Falk GW, Chak A, Wang K, Sharma P. 2012. Development of subsquamous high-grade dysplasia and adenocarcinoma after successful radiofrequency ablation of Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 143(3):564-566.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.051. Epub 2012 May 3. PMID: 22561053; PMCID: PMC5511030.

- Tokuyama M, Geisler D, Deitrick C, Fasanella KE, Chennat JS, McGrath KM, Pai RK, Davison JM. 2020. Use of p53 immunohistochemistry in conjunction with routine histology improves risk stratification of patients with Barrett's oesophagus during routine clinical care. *Histopathology*. 77(3):481-491. doi: 10.1111/his.14143. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32431062.
- Tran T, Spechler SJ, Richardson P, El-Serag HB. 2005. Fundoplication and the risk of esophageal cancer in gastroesophageal reflux disease: a Veterans Affairs cohort study. *Am J Gastroenterol*. 100(5):1002-8. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41007.x. PMID: 15842570.
- Tuyns AJ, Péquignot G, Abbatucci JS. 1979. Oesophageal cancer and alcohol consumption; importance of type of beverage. *Int J Cancer*. 23(4):443-7. doi: 10.1002/ijc.2910230402. PMID: 437923.!!!
- van Munster S, Nieuwenhuis E, Weusten BLAM, Alvarez Herrero L, Bogte A, Alkhalaf A, Schenk BE, Schoon EJ, Curvers W, Koch AD, van de Ven SEM, de Jonge PJF, Tang TJ, Nagengast WB, Peters FTM, Westerhof J, Houben MHMG, Bergman JJ, Pouw RE; Dutch Barrett Expert Centers. 2022. Long-term outcomes after endoscopic treatment for Barrett's neoplasia with radiofrequency ablation ± endoscopic resection: results from the national Dutch database in a 10-year period. *Gut*. 71(2):265-276. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322615. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33753417; PMCID: PMC8762001.
- Wallace MB, Sharma P, Lightdale C, Wolfsen H, Coron E, Buchner A, Bajbouj M, Bansal A, Rastogi A, Abrams J, Crook JE, Meining A. 2010. Preliminary accuracy and interobserver agreement for the detection of intraepithelial neoplasia in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc*. 72(1):19-24. doi: 10.1016/j.gie.2010.01.053. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20381042; PMCID: PMC3144146.
- Wallace M, Lauwers GY, Chen Y, Dekker E, Fockens P, Sharma P, Meining A. 2011. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy*. 43(10):882-91. doi: 10.1055/s-0030-1256632. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21818734.
- Wallace MB, Crook JE, Saunders M, Lovat L, Coron E, Waxman I, Sharma P, Hwang JH, Banks M, DePreville M, Galmiche JP, Konda V, Diehl NN, Wolfsen HC. 2012. Multicenter, randomized, controlled trial of confocal laser endomicroscopy assessment of residual metaplasia after mucosal ablation or resection of GI neoplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*. 76(3):539-47.e1. doi: 10.1016/j.gie.2012.05.004. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22749368.
- Wang L, Yu X, Li J, Zhang Z, Hou J, Li F. 2016. Prognostic significance of p53 expression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 16:373. doi: 10.1186/s12885-016-2427-6. PMID: 27370310; PMCID: PMC4930564.
- Wang X, Ouyang H, Yamamoto Y, Kumar PA, Wei TS, Dagher R, Vincent M, Lu X, Bellizzi AM, Ho KY, Crum CP, Xian W, McKeon F. 2011. Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia. *Cell*. 145(7):1023-35. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.026. PMID: 21703447; PMCID: PMC3125107.
- Watanabe M. 2015. Risk factors and molecular mechanisms of esophageal cancer: differences between the histologic subtypes. *J Cancer Metastasis Treat*. 1:1-7.
- Weusten B, Bisschops R, Coron E, Dinis-Ribeiro M, Dumonceau JM, Esteban JM, Hassan C, Pech O, Repici A, Bergman J, di Pietro M. 2017. Endoscopic management of Barrett's esophagus: European Society of

Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. *Endoscopy*. 49(2):191-198. doi: 10.1055/s-0042-122140. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28122386.

Wolf WA, Pasricha S, Cotton C, Li N, Triadafilopoulos G, Muthusamy VR, Chmielewski GW, Corbett FS, Camara DS, Lightdale CJ, Wolfsen H, Chang KJ, Overholt BF, Pruitt RE, Ertan A, Komanduri S, Infantolino A, Rothstein RI, Shaheen NJ. 2015. Incidence of Esophageal Adenocarcinoma and Causes of Mortality After Radiofrequency Ablation of Barrett's Esophagus. *Gastroenterology*. 149(7):1752-1761.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.048. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26327132; PMCID: PMC4785890.

Wong T, Tian J, Nagar AB. 2010. Barrett's surveillance identifies patients with early esophageal adenocarcinoma. *Am J Med*. 123(5):462-7. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.10.013. PMID: 20399324.

Yun S, Tearney G, de Boer J, Iftimia N, Bouma B. 2003. High-speed optical frequency-domain imaging. *Opt Express*. 11(22):2953-63. doi: 10.1364/oe.11.002953. PMID: 19471415; PMCID: PMC2758565.

Zendehdel K, Nyrén O, Luo J, Dickman PW, Boffetta P, Englund A, Ye W. 2008. Risk of gastroesophageal cancer among smokers and users of Scandinavian moist snuff. *Int J Cancer*. 122(5):1095-9. doi: 10.1002/ijc.23076. PMID: 17973262.

Zhang HP, Yang S, Chen WH, Hu TT, Lin J. 2017. The diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric cancer and precancerous lesions among Asian population: a system review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol*. 52(4):382-388. doi: 10.1080/00365521.2016.1275770. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28078907.

Zhang Y. 2013. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 19(34):5598-606. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5598. PMID: 24039351; PMCID: PMC3769895.

Zhou H, Greco MA, Daum F, Kahn E. 2001. Origin of cardiac mucosa: ontogenic consideration. *Pediatr Dev Pathol*. 4(4):358-63. doi: 10.1007/s10024001-0036-z. PMID: 11441337.