

Biomarkery pro neendoskopické vyšetření sliznice jícnu

**Tereza Deissová^{1,2}, Zdeněk Kala³, Ondřej Slabý², Jiří Dolina⁴, Radek Kroupa⁴, Lumír Kunovský^{3,4},
Lydie Izakovičová Hollá^{1,5}, Petra Bořilová Linhartová^{1,5,6,7}**

¹Ústav patologické fyziologie LF MU Brno

²CEITEC MU Brno

³Chirurgická klinika LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

⁴Interní gastroenterologická klinika LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

⁵Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

⁶Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

⁷Ústav lékařské genetiky LF MU Brno

Refluxní choroba jícnu (gastroesophageal reflux disease – GERD) je multifaktoriální onemocnění, na kterém se mimo jiné podílí i genetická predispozice jedince. Při diagnostice GERD a jejích komplikací, jako je Barrettův jícen (Barrett's esophagus – BE) a adenokarcinom jícnu (esophageal adenocarcinoma – EAC), jsou standardně využívány endoskopické metody a histologické vyšetření. Pro screening BE u osob se zvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění i při sledování rozvoje dysplazie BE by vzorky jícnové sliznice mohly být odebrány pomocí novodobých neendoskopických postupů, kterými lze minimalizovat invazivnost zákroku a zlepšit compliance a adherenci pacientů k léčbě. Neendoskopicky odebraný vzorek sliznice jícnu je možné stejně jako vzorek získaný endoskopickou biopsií analyzovat jak imunohistochemickým vyšetřením, tak provést molekulárně biologickou analýzu na specifické biomarkery. Markery jako caudal type homeobox 2 (CDX2) a protein p53 již našly své uplatnění v diagnostice GERD, a proto se výzkum v posledních letech zaměřuje na identifikaci dalších biomarkerů, pomocí kterých by bylo možné spolehlivě predikovat vznik a rozvoj BE nebo EAC. Tento přehledový článek shrnuje informace o moderních neendoskopických metodách odběru vzorků sliznice jícnu a o biomarkerech, které byly v souvislosti s predikcí a diagnostikou BE a EAC studovány v neendoskopicky odebrané tkáni a mají potenciál pro využití v klinické praxi.

Klíčová slova: Barrettův jícen, adenokarcinom jícnu, biomarkery, Cytosponge™, EsoCheck, EsophaCaps™, miRNA, protein p53.

Biomarkers for non-endoscopic examination of esophageal mucosa

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a multifactorial disease; an individual's genetic predisposition may contribute to the development of this disorder. Endoscopic methods and histological examination are commonly used to diagnose GERD and its complications such as Barrett's esophagus (BE) and esophageal adenocarcinoma (EAC). For BE screening in high-risk individuals as well as monitoring the development of BE dysplasia, esophageal mucosa samples could be taken using modern non-endoscopic procedures to minimize invasiveness of the procedure and improve patient adherence and compliance with a treatment. Esophageal mucosa samples taken by non-endoscopic or endoscopic biopsy can be analyzed both by immunohistochemistry and molecular biology analysis for specific biomarkers. Markers such as caudal type homeobox 2 (CDX2) and protein p53 have found their use in GERD diagnosis, and therefore research in recent years has focused on identifying other biomarkers that could reliably predict the development and progression of BE or EAC. This review article summarizes information on modern non-endoscopic methods of sampling from the esophagus mucosa and biomarkers, which have been studied in connection with the prediction and diagnosis of BE and EAC and have a potential for the use in clinical practice.

Key words: Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma, biomarkers, Cytosponge™, EsoCheck, EsophaCaps™, miRNA, protein p53.

Úvod

Barrettův jícen (Barrett's esophagus – BE) vznikající v důsledku chronické refluxní choroby jícnu (gastroesophageal reflux disease – GERD) je stav, při kterém dochází v distální části jícnu k transformaci dlaždicového buněčného epitelu na cylindrický epitel s intestinální metaplazií. Onemocnění je standardně diagnostikováno na základě endoskopického vyšetření, bioptického odběru tkáně jícnu a nálezu metaplastického epitelu intestinálního typu při histologickém vyšetření (1).

BE bývá náhodně zachycen u přibližně 1,2–25 % osob se zcela chybějícími refluxními symptomy (s tzv. tichou GERD) (2). Přibližně 40 % pacientů s adenokarcinomem jícnu (esophageal adenocarcinoma – EAC) nemá v předchozí anamnéze nálezy symptomů GERD (1). Na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti BE lze charakterizovat 2 typy EAC, u téměř poloviny pacientů se EAC nevyskytuje v terénu intestinální metaplazie (3). Celopopulační screening, tak jak ho známe např. u kolorektálního karcinomu, by byl s ohledem na náklady a nízkou míru prevalence BE neefektivní. Avšak mohl by najít své uplatnění u jedinců s rizikovými faktory, mezi které patří: věk nad 50 let, mužské pohlaví, bílá rasa, intraabdominální obezita, chronické GERD symptomy, ale také pozitivní rodinná anamnéza BE nebo EAC u příbuzných prvního stupně (1, 4). Pacienti, kteří podstoupili jak endoskopii, tak neendoskopické vyšetření, uvedli, že vyšetření neendoskopickými metodami je rychlejší a komfortnější, což by mohlo přispět ke zlepšení compliance a adherence k léčbě u těch pacientů, kteří z endoskopického vyšetření mají obavy (5).

Včasné zachycení pacientů s dysplastickými a neoplastickými změnami je klíčové pro možnost jejich kurativního řešení (4). U pacientů s BE bez dysplastických změn (NDBE – non-dysplastic Barrett's esophagus) je endoskopie indikována jednou za 3–5 let, u dysplastických nálezů BE se intervaly zkracují (6), nicméně EAC se vyvine během sledování asi u 0,2–0,5 % pacientů s NDBE za rok (7).

Přestože standardní endoskopie a biopsie zůstávají nejdůležitějším nástrojem pro hodnocení onemocnění slizničních změn v jícnu, při screeningu BE by mohly být nahrazeny jednoduchými neendoskopickými metodami odběru vzorku, které mají lepší toleranci, a které lze

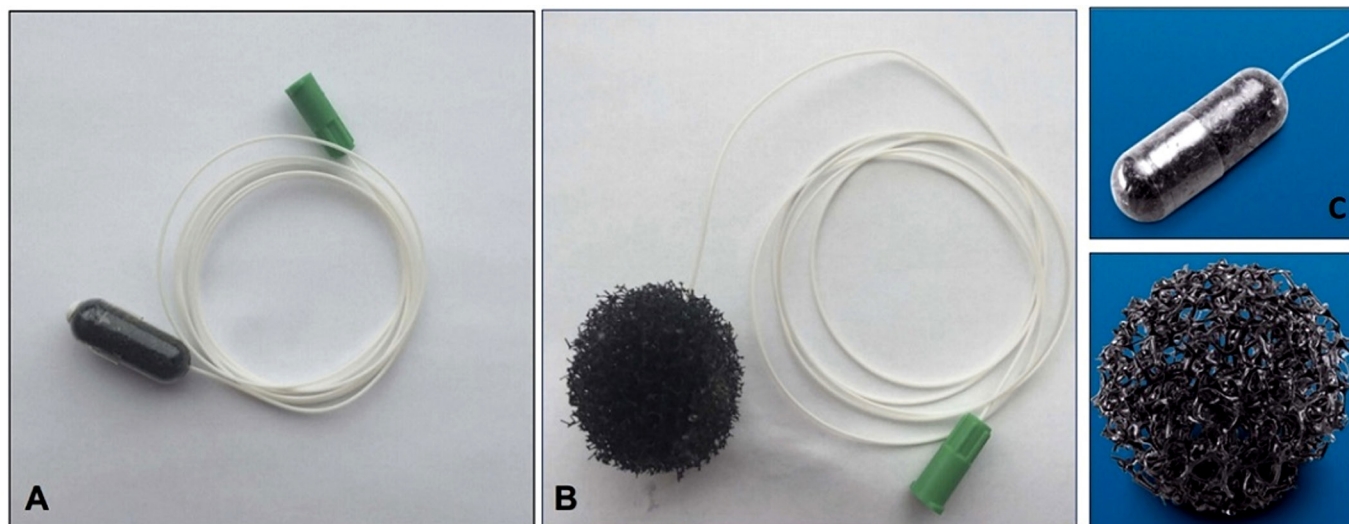
provádět v prostředí primární péče a při nižších časových nákladech. Stejně jako endoskopicky odebraná tkáň i tyto neendoskopicky získané vzorky mohou být analyzovány pomocí histologické a imunohistochemické (IHC) diagnostiky a molekulárně biologickými metodami (8, 9). Ačkoliv je endoskopický přístup při odběru vzorků vhodnější pro následnou histologickou analýzu (především cytologickou), tak u neendoskopických metod odběru vzorku je možnou předností to, že stěr obsahuje buňky z celé cirkumference distálního jícnu, čímž se šance na zjištění intestinální metaplazie zvyšuje.

Neendoskopické metody odběru vzorků sliznice jícnu

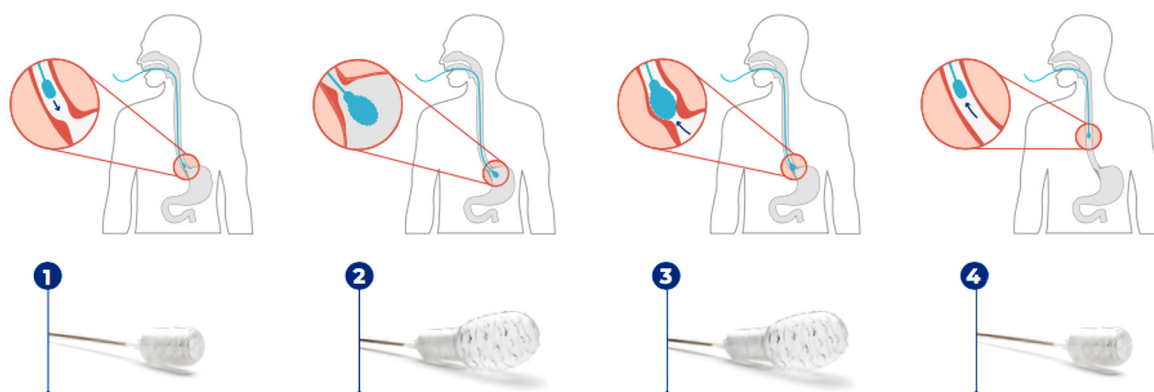
K neendoskopickému získání vzorku sliznice jícnu může být využit EsoPhaCapsTM (Capnostics LLC; Doylestown PA) nebo podobný systém CytospongeTM (Medtronic GI Solutions) (10). V obou případech se jedná o malou houbičku uzavřenou v želatinové kapsli s navázaným vláknem (Obr. 1). Pacient si vloží kapsli do úst a spolkně ji při zapití vodou, přitom vlákno volně drží v ruce. Po 5 minutách se želatinová kapsle v žaludku rozpustí a uvolní se kulovitá polyuretanová houbička o průměru 3 cm. Pacientovi je pomocí spreje aplikováno lokální anestetikum (např. 1% lidokain) do dutiny ústní a následně je houbička pomocí vlákna vytáhena. Po odběru je vlákno od houbičky odděleno a houbička s přilnutými povrchovými buňkami jícnu je umístěna do konzervační tekutiny (Cytolyt) pro následné zpracování. Pro cytopatologické a IHC vyšetření je třeba buněčnou suspenzi centrifugovat, buněčný pelet zafixovat resuspendací ve formalinu, opět centrifugovat a převést jej do parafinu. Parafinový bloček je následně nařezán, přenesen na sklíčko a nabarven standardním postupem hematoxylin-eozinem, nebo je zpracován pro IHC detekci vybraných proteinů (11). K detekci genetických biomarkerů pomocí molekulárně biologických přístupů (PCR nebo sekvenování nové generace – next generation sequencing – NGS) je třeba ze suspenze buněk izolovat RNA nebo DNA, a tu analyzovat (12, 13).

Další alternativu představuje EsoCheck (PAVmed Inc), který na rozdíl od předchozích dvou metod disponuje malým nafukovacím balonkem s hrubým povrchem a 68 cm dlouhým katétre, díky kterému může být

Obr. 1. EsoPhaCapTM s uzavřenou houbičkou (A), s extrahovanou houbičkou (B) (11), CytospongeTM (C) (10)



Obr. 2. EsoCheck je spolknut (1), balónek je v žaludku nafouknut (2), pomocí orientačních značek na katetru je EsoCheck vytažen asi 5 cm proximálně od gastroezofageální junkce (3), balónek je vyfouknut pro zabránění kontaminace a vyjmut (4) (14)



balónek v žaludku nafouknut a opětovně vyfouknut asi 5 cm proximálně od gastroezofageální junkce, což výrazně snižuje riziko kontaminace vzorku během vyjmutí aparátu (Obr. 2) (14).

Tyto neendoskopické postupy odběru jícnové tkáně jsou kontraindikovány u pacientů s dysfagií, poruchami polykání, známými anatomickými abnormalitami jícnu a u pacientů užívajících antikoagulanty (10).

Slizniční (tkáňové) biomarkery pro Barrettův jícen

Analýzou vhodných biomarkerů ve sliznici jícnu je možné predikovat vznik a rozvoj BE i EAC. Pojmem biomarker v souvislosti s tímto kontextem rozumíme indikátor, u kterého sledujeme jeho:

- i) genové alterace (mutace),
- ii) epigenetické modifikace (metylace, acetylace),

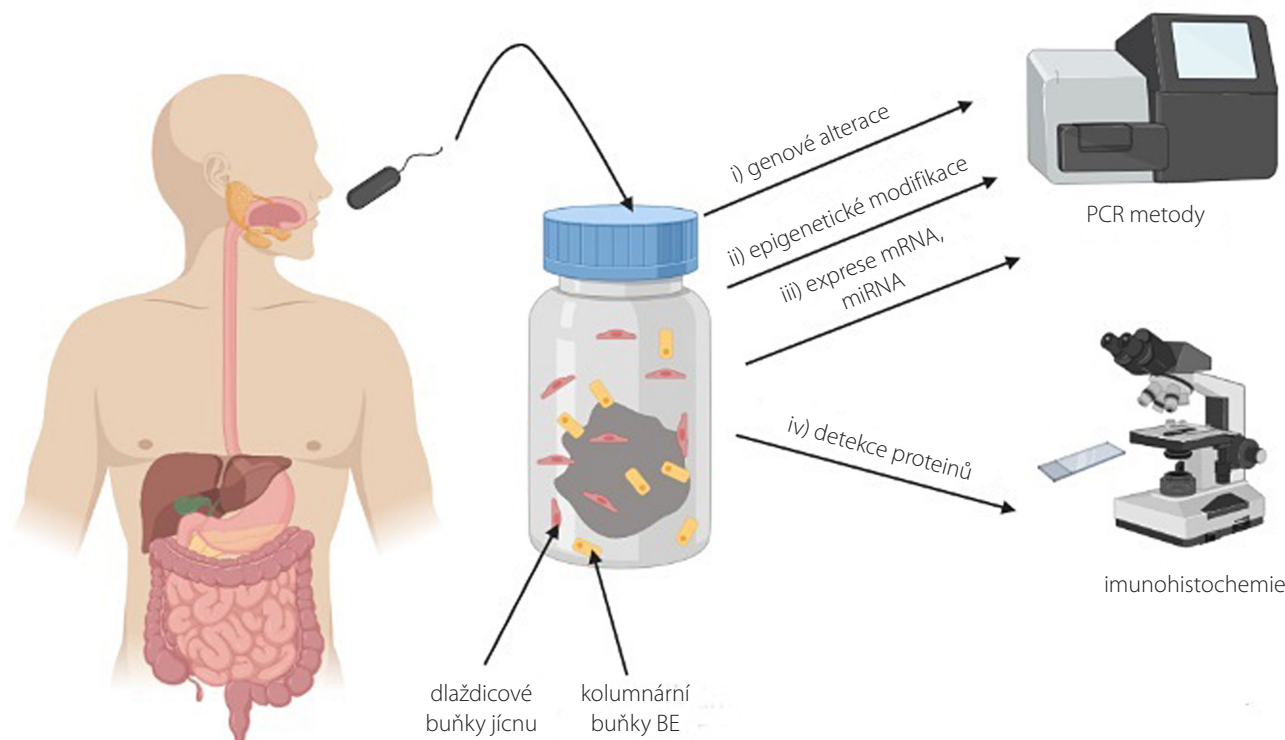
- iii) genovou expresi mediátorové RNA (mRNA) i mikroRNA (miRNA) a/nebo
- iv) detekujeme protein nebo peptid ve tkáni.

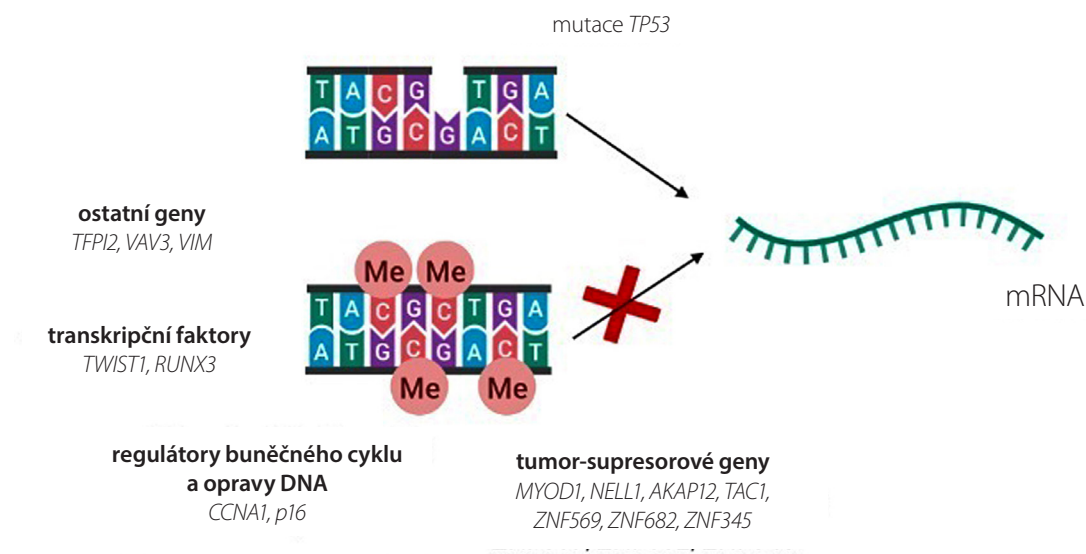
K analýze genových alterací, epigenetických modifikací a exprese genů je využíváno molekulárně biologických přístupů, jejichž výhodami jsou automatizace pro zpracování velkého počtu vzorků a objektivita, neboť metody obcházejí subjektivní hodnocení při IHC využívané při detekci proteinových biomarkerů (Obr. 3) (15, 16).

Genetické biomarkery v kombinaci s neendoskopickými metodami

Protein p53 je transkripční faktor, který reguluje buněčný cyklus při poškození DNA. Inaktivující mutace v genu pro p53 (TP53) vznikající v průběhu neoplazie vedou buď k úplné ztrátě proteinu p53, nebo ke zvýšené expresi genu TP53 (Obr. 4) (17). Pro detekci mutací ve struktuře

Obr. 3. Vyšetření biomarkerů ve vzorku jícnové sliznice získaných neendoskopickou metodou (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)



Obr. 4. Genetické a epigenetické markery pro BE v kombinaci s neendoskopickým odběrem vzorků sliznice jícnu (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)

genu pro tento nádorový supresor lze využít techniky založené na PCR i NGS. Genetické změny typické pro nádorové buňky mohou být užitečným prognostickým markerem, slouží k hodnocení „low“ a „high grade“ dysplazií (LGD a HGD). Mutační analýzu genu TP53 zprostředkovává např. Oddělení lékařské genetiky FN Brno (18).

Epigenetické biomarkery v kombinaci s neendoskopickými metodami

Epigenetické alterace sice nezasahují do primární sekvence molekuly DNA, nicméně mohou významně ovlivňovat genovou expresi a v konečném důsledku i koncentraci proteinu, který kódují (Obr. 4) (16).

K identifikaci hypermetylovaných genů lze využít systém Illumina 27k array, díky kterému jsme schopni kvantifikovat úroveň metylace ve specifických lokusech genomu (19), nebo lze sekvenovat celý metylom (20). Výsledky získané sekvenováním DNA ze zdravé dlaždicové tkáně jícnu jsou následně porovnávány se vzorky BE (19). Tímto způsobem byly analyzovány metylace genů pro **faktor výměny guanidinových nukleotidů** (VAV3), **transkripční faktor Twist-related protein 1** (TWIST1), **regulátor buněčného cyklu cyklin A1** (CCNA1) a **vimentin** (VIM) a shledány jako vhodné biomarkery pro BE (15, 19, 20).

V souvislosti s BE byly dále studovány hypermetylace a s nimi spojené inaktivace proapoptických genů jako **Runt-related transkripční faktor 3** (RUNX3), genů zapojených do kontroly buněčného cyklu jako **cyklin dependentní kináza p16** nebo reparace DNA a tumor-supresorových genů, jako jsou **myoblast determinující protein 1** (MYOD1), **protein kináza C-vzájemný protein** (NELL1), **A-kináza ukotvující protein 12** (AKAP12) nebo **protachykinin 1** (TAC1) (21). Dále z rodiny tumor-supresorových genů byly analyzovány metylace genů pro některé **proteiny se strukturními motivy zinkových prstů** (ZNF). Tyto proteiny jsou díky své struktuře schopny interakce s DNA, RNA i jinými proteiny a podílejí se tak na transkripční regulaci, ubikvitinem zprostředkované degradaci proteinu, transdukcí signálu, migraci buněk a opravě DNA. Navíc bylo zjištěno, že mohou být zapojené jak do karcinogeneze, tak do tvorby metastáz (22).

V procesu metastazování, tedy uvolnění nádorových buněk z primárního ložiska, je zapotřebí degradace extracelulární matrix, na které se podílejí různé druhy proteináz. Inhibitor cesty tkáňového faktoru 2 (TFPI2) vykazuje silnou inhibiční aktivitu proti celé řadě těchto proteináz, tím chrání extracelulární matrix proti degradaci a s ní spojenou migraci nádorových buněk. TFPI2 je často metylován u karcinomu jícnu (23).

Biomarkery exprese genů v kombinaci s neendoskopickými metodami

Mezi tyto biomarkery můžeme zařadit méně studované exprese mRNA a miRNA, k jejichž analýze se využívá expresních čipů nebo RNA sekvenování (16).

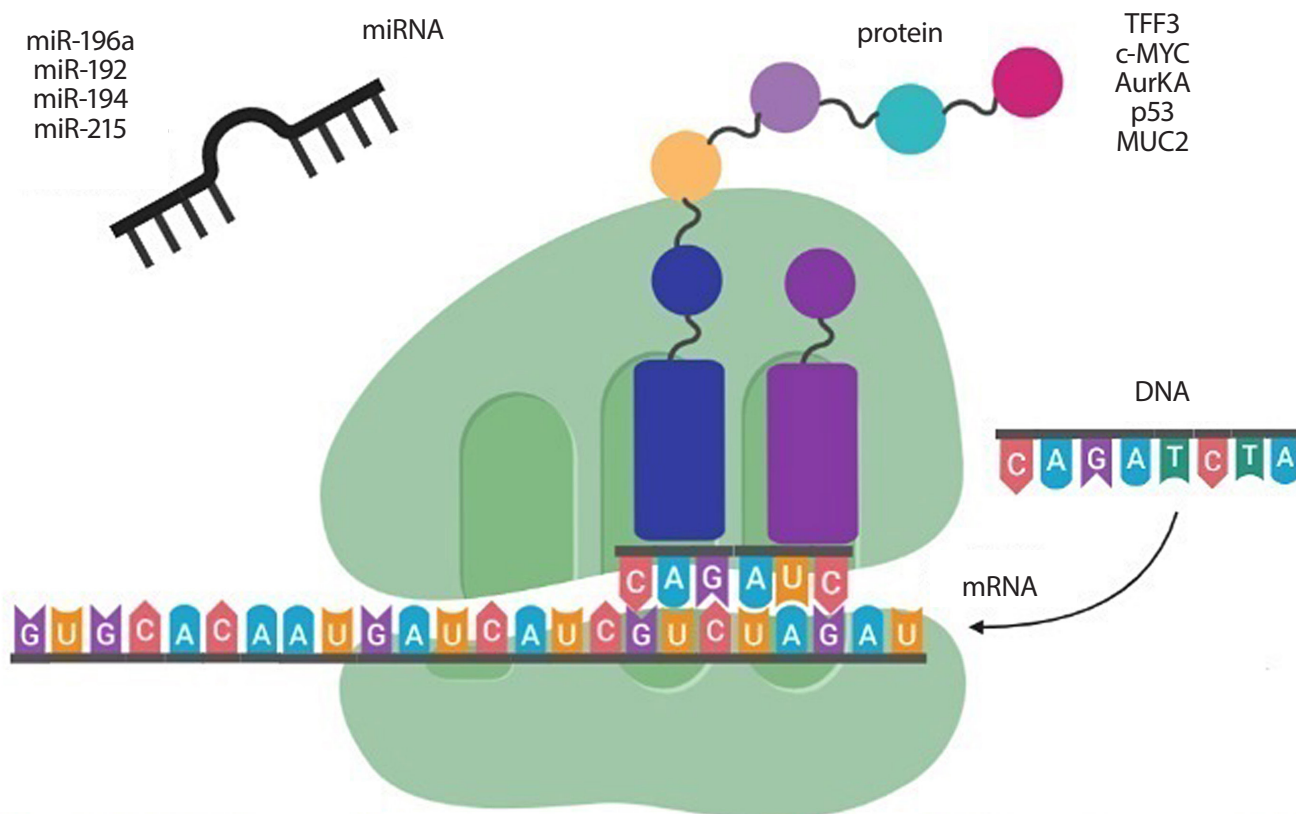
miRNA jsou malé nekódující molekuly RNA, které rozpoznají cílovou sekvenci mRNA a inhibují tak překlad mRNA do proteinu (24). Kromě toho jsou profily miRNA úzce spojovány se specifickou tkání nebo onemocněním a v biologických vzorcích jsou vysoce stabilní. Například ve vzorcích jícnu odebraných neendoskopickými metodami byly s BE asociovány miR-192, miR-194, miR-196a a miR-215 (Obr. 5) (12). Problematice miRNA v kontextu s GERD se v České republice věnuje tým prof. Slabého, který v endoskopicky odebrané tkáni BE i EAC zaznamenal signifikantně zvýšenou expresi miR-192 a miR-194 v porovnání s normální jícnovou tkání (25).

Proteinové a peptidové biomarkery v kombinaci s neendoskopickými metodami

Ke stanovení koncentrace proteinového biomarkery ve vzorku jícnové tkáně je nejčastěji využívána technika IHC, tedy barvení proteinu specifickými protilátkami. Pro posouzení dysplazie u pacientů s BE doporučuje Britská gastroenterologická společnost IHC vyšetření výše zmíněného **proteinu p53** (26).

Dalšími studovanými biomarkery v souvislosti s neendoskopickými metodami jsou peptidy z **rodiny trifolátového faktoru** (TFF). Rodina je tvořena třemi peptidy TFF1, TFF2 a TFF3 vyskytujícími se v buňkách

Obr. 5. Biomarkery exprese genů a proteinové biomarkery pro BE v kombinaci s neendoskopickým odběrem vzorků sliznice jícnu (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)

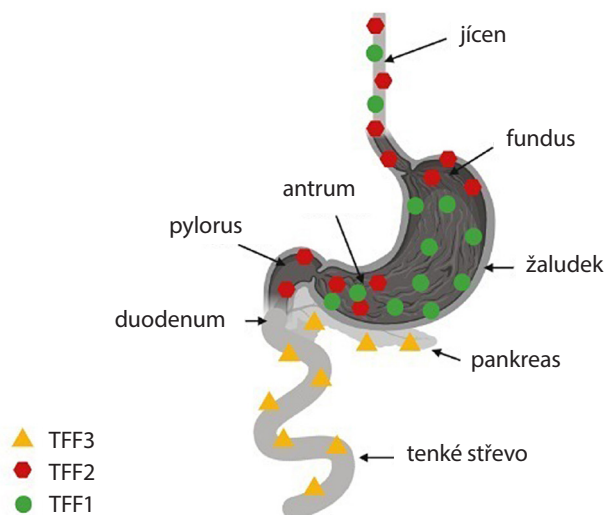


produkcí mucin, který se svými protizánětlivými, angiogenními a reparačními účinky podílí na ochraně a obnově žaludeční a intestinální sliznice. Za fyziologických podmínek je exprese genů těchto peptidů tkáňově (buněčně) specifická (Obr. 6), proto může být stanovení jejich koncentrace využito k detekci a hodnocení intestinální metaplasie (27).

Dále jsou s BE asociovány potenciální biomarkery **proto-onkogen c-Myc, aurora kináza A (AurKA)** a **mucin 2 (MUC2)** (Obr. 5). Protein c-Myc se uplatňuje v regulaci buněčného metabolismu či růstu a nadměrná exprese jeho genu je spojována s metabolickými procesy vedoucími ke zvýšené tvorbě nukleových kyselin, proteinů a lipidů, které jsou nezbytné pro rychlou buněčnou proliferaci transformovaných buněk (28). AurKA je regulátorem mitózy, přičemž její zvýšená exprese je asociována s nestabilitou chromozomů a aneuploidií (změna počtu chromozomů) ovlivňující vývoj BE směrem k EAC (29). MUC2 je hlavní intestinální mucin produkovaný pohárkovými buňkami v gastrointestinálním traktu. V dysplastických a EAC vzorcích je však IHC proteinu MUC2 negativní, což výrazně snižuje senzitivitu screeningového testu pro BE (11).

Přestože se žádný biomarker zatím nedostal do stadia rutinního klinického používání (26), některé laboratoře nabízejí ke standardnímu histologickému vyšetření endoskopicky odebrané jícnové tkáně také IHC doplňkové vyšetření proteinu p53, kterým lze dobře hodnotit stupeň dysplazie, nebo analýzu specifického proteinu pro intestinální epitel tzv. caudal type homeobox 2 (CDX2), který se využívá pro potvrzení BE s pohárkovými buňkami, ale i bez nich (30, 31).

Obr. 6. Expres peptidů TFF v gastrointestinálním traktu (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)



V literatuře jsou prezentovány výsledky studií, jejichž cílem je identifikace dalších biomarkerů, které by mohly spolu s klinickými a environmentálními faktory predikovat vznik a rozvoj BE nebo EAC (26). Všechny dosud studované biomarkery, které byly testovány v kombinaci s neendoskopickými metodami odběru vzorků sliznice jícnu a u kterých byla hodnocena senzitivita a specifita, jsou shrnuty v Tab. 1.

Aby se neendoskopická screeningová technika pro BE mohla stát součástí standardní klinické praxe, měla by být její specifita a senzitivita

Tab. 1. Studované biomarkery v kombinaci s neendoskopickými metodami odběru vzorků jícnové sliznice

Detekce	Počet osob (kontroly*/ případy)	Odběr vzorků jícnové tkáně	Biomarker	Metoda stanovení	Specifita %	Senzitivita %	citace [§]
BE	0/501	Cytosponge	TFF3	IHC	83,8 ^a /93,5 ^b	73,3 ^a /90,0 ^b	[34]
BE	445/596	Cytosponge	TFF3	IHC	92,4	79,9/87,2 ^c	[35]
progrese do LDG/HDG	376 NDBE/92 dysplázie	Cytosponge	TP53 mutace	NGS	85,0	58,0	[36]
			c-Myc	IHC	72,0	63,0	
			AurKA	IHC	70,0	78,0	
			p53	IHC	96,0	58,0	
			MYOD1 metylace	MethyLight PCR	67,0	64,0	
			RUNX3 metylace	MethyLight PCR	74,0	60,0	
BE	139/169	Cytosponge	TFPI2 metylace	MethyLight PCR	95,7	82,2	[19]
			TWIST1 metylace	MethyLight PCR	93,0	69,8	
			ZNF345 metylace	MethyLight PCR	100,0	62,4	
			ZNF569 metylace	MethyLight PCR	99,2	59,1	
BE	20/20	Esophacap	VAV3 + ZNF682 metylace	metylačně specifická qPCR	100,0	100,0	[20]
BE	26/38	Cytosponge	expresse miR-196a, miR-192, miR-194 a miR-215 v kombinaci s TFF3	qPCR a IHC	93,7	93,1	[12]
progrese do NDBE	36/50	EsoCheck	VIM + CCNA1 metylace	NGS	91,7	90,3/94,4 ^c	[15]
BE	14/14	Esophacap	p16, NELL1, AKAP12, TAC1 metylace	metylačně specifická qPCR	62,2 [#]	94,4 [#]	[13]
BE	34/102	Esophacap	MUC2	IHC	100,0	54,2	[11]

*kontroly – jedinci s dyspepsií nebo refluxními symptomy bez endoskopické evidence NDBE, BE, dysplazie nebo EAC

a ≥ 1 cm dlouhý segment BE, b ≥ 2 cm dlouhý segment BE, c ≥ 3 cm dlouhý segment BE

#v kombinaci s věkem

§studie seřazené dle roku publikování vzestupně

alespoň 90 % nebo vyšší. Zatímco specifita je definována jako pravděpodobnost, že test je negativní u osob bez hledaného onemocnění, tak senzitivita udává charakteristiku klinického testu korektně identifikovat pacienty s daným onemocněním (32). Specifita i senzitivita mohou být ovlivněny délkou segmentu Barrettova jícnu. Tento trend je analogický i u endoskopické metody, kdy se diagnostika intestinální metaplasie zlepšuje s délkou segmentu Barrettova jícnu a počtem odebraných biopsií (1).

Testovací technika by dále měla být nákladově efektivní, přijatelná pro testovanou populaci, dobře implementovatelná do prostředí primární péče nebo do rutinní gastroenterologické praxe, a především účinná ve snížení incidence a mortality EAC (33).

Závěr

Včasná detekce dysplazie a časného EAC jícnu může být nesnadná, protože většina pacientů je asymptomatická, dokud neprogredují do pokročilejších a kurabilně neléčitelných stadií. Celoplošný endoskopický screening těchto asymptomatických jedinců je z hlediska invazivnosti, časové náročnosti, a především nízké míry prevalence BE a EAC nereálný.

Řešením by mohlo být využití neinvazivních neendoskopických metod (Cytosponge™, Esophacaps™, Esocheck) s následným stanovením genetických, epigenetických, genové expresních a proteinových či peptidových biomarkerů u rizikové populace a pacientů s NDBE.

Vyšetření neendoskopickými metodami je rychlé a komfortnější, což by mohlo zlepšit compliance a adherenci k vyšetření a následné léčbě u těch pacientů, kteří mají z endoskopického vyšetření obavy. Ve zdravotních systémech (např. v USA) s vysokou cenou endoskopie mohou být pro využití jiné než endoskopické diagnostiky i ekonomické důvody (37). Tímto přístupem je možné zachytit BE s vysokou specifitou a senzitivitou u asymptomatických rizikových jedinců či sledovat vznik LGD/HDG a vyselektovat pacienty s vysokým rizikem vzniku EAC. Největší potenciál v tomto směru mají epigenetické biomarkery, tj. metylace VAV3 + ZNF682 (senzitivita i specifita 100 %) a VIM + CCNA1 (senzitivita 90,3 %; specifita 91,7 %), biomarkery genové exprese miR-196a, miR-192, miR-194 a miR-215 v kombinaci s detekcí proteinu TFF3 (senzitivita 93,1 %; specifita 93,7 %).

Stále se hledají efektivnější možné kombinace potenciálních biomarkerů, díky kterým by bylo možné včas diagnostikovat samotné onemocnění, ale také zachytit progresi onemocnění, které by predikovaly terapeutickou odpověď a které by otvíraly možnosti nových terapeutických cílů (38). Pro implementaci poznatků do klinické praxe je zapotřebí dalších studií a spolupráce multidisciplinárních týmů vědců základního a klinického výzkumu a odborných lékařů (gastroenterologů, patologů a chirurgů).

Granty a finanční podpora

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU20-03-00126 a z grantu MZČR-RVO (FNBr, 65269705, Sup 16/19).

LITERATURA

1. Clermont M, Falk WG. Clinical guidelines update on the diagnosis and management of Barrett's esophagus. Dig Dis Sci 2018; 63: 2122–2128.

2. Fass R, Dickman R. Clinical Consequences of Silent Gastroesophageal Reflux Disease. Curr Gastroenterol Rep 2006; 8: 194–200.

3. Sawas T, Killcoyne S, Iyer PG, et al. Identification of Prognostic Phenotypes of Esophageal Adenocarcinoma in 2 Independent Cohorts. *Gastroenterology* 2018; 155: 1720–1728.
4. Kroupa R. Barrettův jícen, rizikové faktory, léčba. *Interní Med* 2012; 14: 104–106.
5. Freeman M, Offman J, Walter MF, et al. Acceptability of the Cytosponge procedure for detecting Barrett's oesophagus: a qualitative study. *BMJ Open* 2017; 7: e013901.
6. Shaheen N, Falk GW, Iyer PG, et al. ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2016; 111: 30–50.
7. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragnauth K, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut* 2014; 63: 7–42.
8. Iqbal U, Siddique O, Ovalle A, et al. Safety and efficacy of a minimally invasive cell sampling device ('Cytosponge') in the diagnosis of esophageal pathology: a systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018; 30: 1261–1269.
9. Katzka AD. Recent Advances in Non-invasive Esophageal Tissue Sampling. *Curr Gastroenterol Rep* 2017; 19: 9.
10. Szoka N, Fazi J. 2019. Cytosponge™ – A SAGES Technology and Value Assessment. SAGES - Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons (online). Dostupné z: <https://www.sages.org/publications/tavac/cytosponge/>
11. Zhou Z, Kalatskaya I, Russell D, et al. Combined EsophCap cytology and MUC2 immunohistochemistry for screening of intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma. *Clin Exp Gastroenterol* 2019; 12: 219–229.
12. Li X, Kleeman S, Coburn SB, et al. Selection and Application of Tissue microRNAs for Nonendoscopic Diagnosis of Barrett's Esophagus. *Gastroenterology* 2018; 155: 771–783.
13. Wang Z, Kambhampati S, Cheng Y, et al. Methylation Biomarker Panel Performance in EsophCap Cytology Samples for Diagnosing Barrett's Esophagus: A Prospective Validation Study. *Clin Cancer Res* 2019; 1: 2127–2135.
14. EsoCheck | Lucid Diagnostics | United State. Lucid Diagnostics | Biomarkers for Esophageal Cancer | New York (online). Copyright © 2019 Lucid Diagnostics (cit. 23.10.2019). Dostupné z: <https://www.lucidddx.com/esochek>
15. Moinova HR, LaFramboise T, Lutterbaugh JD, et al. Identifying DNA methylation biomarkers for non-endoscopic detection of Barrett's esophagus. *Sci Transl Med* 2018; 17: pii: eaao5848.
16. Qureshi AP, Stachler MD, Haque O, et al. Biomarkers for Barrett's esophagus – a contemporary review. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18: 939–946.
17. Naini VB, Souza FR, Odze DR. Barrett's Esophagus: A Comprehensive and Contemporary Review for Pathologists. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: e45–e66.
18. Mutační analýza genu p53 – Oddělení lékařské genetiky FN Brno. Oddělení lékařské genetiky FN Brno (online). Copyright © 2016 (cit. 25.10.2019). Dostupné z: <https://genetikabrno.eu/vysetrujeme/mutacni-analyza-genu-p53/>
19. Chettouh H, Mowforth O, Galeano-Dalmau N, et al. Methylation panel is a diagnostic biomarker for Barrett's oesophagus in endoscopic biopsies and nonendoscopic cytology specimens. *Gut* 2018; 67: 1942–1949.
20. Iyer PG, Taylor WR, Johnson ML, et al. Highly Discriminant Methylated DNA Markers for the Non-endoscopic Detection of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2018; 113: 1156–1166.
21. Kailasam A, Mittal KS, Agrawal KD. Epigenetics in the Pathogenesis of Esophageal Adenocarcinoma. *Clin Transl Sci* 2015; 8: 394–402.
22. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 2017; 3: 17071.
23. Jia Y, Yang Y, Brock VM, et al. Methylation of TFPI-2 is an early event of esophageal carcinogenesis. *Epigenomics* 2012; 4: 135–146.
24. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006; 108: 3646–3653.
25. Slaby O, Srovnal J, Radova L, et al. Dynamic changes in microRNA expression profiles reflect progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2015; 36: 521–527.
26. Konda AJV, Souza FR. Biomarkers of Barrett's Esophagus: From the Laboratory to Clinical Practice. *Dig Dis Sci* 2018; 63: 2070–2080.
27. Fabisiak A, Bartoszek A, Kardas G, et al. Possible application of trefoil factor family peptides in gastroesophageal reflux and Barrett's esophagus. *Peptides* 2019; 115: 27–31.
28. Miller MD, Thomas DS, Islam A, et al. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 5546–5553.
29. Rugge M, Fassan M, Zaninotto G, et al. Aurora kinase A in Barrett's carcinogenesis. *Hum Pathol* 2010; 41: 1380–1386.
30. CGB laboratoře. CGB laboratoře (online). Copyright © 2016, CGB laboratoř a.s. (cit. 20.09.2019). Dostupné z: <http://www.pathology.cz/>
31. Groisman MG, Amar M, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. *Mod Pathol* 2004; 17: 1282–1288.
32. Lalkhen GA, McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2008; 8: 221–223.
33. Thota, Chak. Mass Screening for Barrett's esophagus: Myth or Reality? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; 17: 610–612.
34. Kadri SR, Lao-Sirieix P, O'Donovan M, et al. Acceptability and accuracy of a non-endoscopic screening test for Barrett's oesophagus in primary care: cohort study. *BMJ* 2010; 10; 341: c4372.
35. Ross-Innes CS, Debiram-Beecham I, O'Donovan M, et al. Evaluation of a minimally invasive cell sampling device coupled with assessment of trefoil factor 3 expression for diagnosing Barrett's esophagus: a multi-center case-control study. *PLoS Med* 2015; 29; e1001780.
36. Ross-Innes CS, Chettouh H, Achilleos A, et al. Risk stratification of Barrett's oesophagus using a non-endoscopic sampling method coupled with a biomarker panel: a cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017; 2: 23–31.
37. Kroupa R, Konečný Š, Dolina J. Současné trendy v diagnostice a léčbě refluxní nemoci jícnu. *Vnitř Lék* 2018; 64: 588–594.
38. Svoboda P, Dítě P, Klvaňa P, et al. Rizikové faktory a prediktory progresu Barrettova jícnu do adenokarcinomu. *Vnitř Lék* 2014; 60: 467–473.