

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-177-5-36-41

## Пищевод Баррета: генетические особенности патологического процесса

Белова Г.В.<sup>1</sup>, Руденко О.С.<sup>1</sup>, Кармакова Т.А.<sup>2</sup>, Юдакова М.Е.<sup>1</sup>, Сидоренко В.С.<sup>1</sup><sup>1</sup> Многопрофильный медицинский центр Банка России<sup>2</sup> МНИОИ им. П.А. Герцена-филиала ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России

### Barrett's esophagus: genetic features

G. V. Belova<sup>1</sup>, O. S. Rudenko<sup>1</sup>, T. A. Karmakova<sup>2</sup>, M. E. Yudakova<sup>1</sup>, V. S. Sidorenko<sup>1</sup><sup>1</sup> Multidisciplinary Medical Center of the Bank of Russia<sup>2</sup> MNI OI im. P. A. Herzena of the FSBI NMHC of radiology of the Ministry of health of Russia

**Для цитирования:** Белова Г.В., Руденко О.С., Кармакова Т.А., Юдакова М.Е., Сидоренко В.С. Пищевод Баррета: генетические особенности патологического процесса. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;177(5): 36–41. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-177-5-36-41

**For citation:** Belova G. V., Rudenko O. S., Karmakova T. A., Yudakova M. E., Sidorenko V. S. Barrett's esophagus: genetic features. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;177(5): 36–41. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-177-5-36-41

✉ **Corresponding author:**

**Белова Галина Вячеславовна**

Galina V. Belova

belovagv@inbox.ru

**Белова Галина Вячеславовна**, д.м.н., заместитель главного врача по амбулаторно-поликлинической помощи — заведующая поликлиникой**Руденко Оксана Сергеевна**, врач-эндоскопист эндоскопического отделения**Кармакова Татьяна Анатольевна**, д.б.н., старший научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии**Юдакова Мария Евгеньевна**, зав. отделением патоморфологии**Сидоренко Виктория Сергеевна**, врач-патологоанатом

Galina V. Belova, Deputy Chief physician for outpatient care — head of polyclinic

Oksana S. Rudenko, endoscopist of the endoscopic department

Tatyana A. Karmakova, senior researcher, Department of modifiers and protectors of antitumor therapy

Maria E. Udakova, chief of the department of pathomorphology

Victoria S. Sidorenko, doctor-pathologist of the department of pathomorphology

## Резюме

**Цель исследования:** оценить генетические особенности патологического процесса у пациентов с морфологически подтвержденным ПБ.

**Материалы и методы:** Динамическое наблюдение и лечение пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом пищевод Баррета (ПБ) проводилось в Многопрофильном медицинском центре банка России г. Москвы в период с 2014 по 2019 г. В исследование были включены 52 пациента. Среди них мужчин — 33 (63,4%) и женщин — 19 (36,5%) в возрасте от 28 до 70 лет, пик заболеваемости приходился преимущественно в возрастной промежуток от 50–71 года. В результате в момент проведения исследования были выявлены морфологические типы эпителия ПБ: в результате исследования были выявлены морфологические типы эпителия ПБ: кардиальный — 8 (15,3%), тонкокишечный — 25 (48%), толстокишечный без дисплазии — 17 (32,6%) и толстокишечный с фокусами дисплазии легкой степени — 2 (3,8%).

Исследование экспрессии генов p53, p63 и Ki-67, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток было проведено иммуногистохимическим методом.

**Результаты.** В результате проведенного исследования были выявлено, что генетические изменения у пациентов с морфологически подтвержденным ПБ увеличиваются от кардиального типа эпителия в сегменте к выявлению фокусов дисплазии на фоне толстокишечной метаплазии. Исключением является тококишечная метаплазия, что может являться косвенным признаком развития высокодифференцированного эпителия в ответ на гастроэзофагеальный или дуоденогастроэзофагеальный рефлюкс

### Выводы.

1. Мутация генов p53, отвечающего за регуляцию клеточной транскрипции и активацию апоптоза и гена p63, ответственного за дифференцировку клеток встречается при всех морфологических типах ПБ, при этом число мутаций увеличивается по мере прогрессирования метастатических изменений в соответствии с каскадом Correa
2. Сочетание мутаций генов p53 и p63 практически в равных соотношениях, свидетельствует о параллельных процессах нарушения пролиферации и дифференцировки клеток.

3. Экспрессия Ki-67 увеличивается от кардиального типа эпителия в сегменте к выявлению фокусов дисплазии на фоне метаплазированного эпителия. Исключением является тонкокишечная метаплазия, что может являться косвенным признаком развития высокодифференцированного эпителия в ответ на гастроэзофагеальный или дуоденогастроэзофагеальный рефлюкс.

**Заключение.** Проведенные исследования, показали, что существует целый ряд генетических особенностей патологического процесса у пациентов с морфологически подтвержденным ПБ, сочетание которых дает большую достоверность и надежность оценки риска неопластических изменений, чем отдельно взятые показатели.

На сегодняшний день остается актуальной разработка панели маркеров, пригодной к использованию в условиях клинической практики, информативной как для оценки индивидуального риска, так и для стратификации групп риска, а также полезной для контроля эффективности проведенного лечения.

**Ключевые слова:** пищевод Баррета, генетические особенности

## Summary

**The aim** of the study was to evaluate the genetic characteristics of the pathological process in patients with biopsy-proven PB.

**Materials and methods:** Dynamic observation and treatment of patients with morphologically confirmed diagnosis of Barrett's esophagus (PB) was performed at the Bank of Russia Multidisciplinary medical center in Moscow in the period from 2014 to 2019. The study included 52 patients. Among them, men — 33 (63.4%) and women — 19 (36.5%) aged from 28 to 70 years, the peak incidence was mainly in the age range from 50–71 years. As a result, morphological types of PB epithelium were identified at the time of the study: cardiac — 8 (15.3%), small — bowel — 25 (48%), large-bowel without dysplasia — 17 (32.6%) and large-bowel with mild dysplasia foci — 2 (3.8%).

The expression of the p53, P63, and Ki-67 genes responsible for cell proliferation and differentiation was studied using an immunohistochemical method.

**Results.** As a result of the study, it was found that genetic changes in patients with morphologically confirmed PB increase from the cardiac type of epithelium in the segment to the detection of dysplasia foci on the background of colonic metaplasia. An exception is tokokishechnaya metaplasia, which may be an indirect sign of the development of highly differentiated epithelium in response to gastroesophageal or duodenogastroesophageal reflux.

### Summary.

1. Mutation of the p53 genes responsible for regulating cell transcription and activating apoptosis and the P63 gene responsible for cell differentiation occurs in all morphological types of PB, with the number of mutations increasing as metastatic changes progress in accordance with the Correa cascade.
2. The combination of p53 and P63 gene mutations in almost equal proportions indicates parallel processes of cell proliferation and differentiation disorders.
3. Ki-67 expression increases from the cardiac type of epithelium in the segment to the detection of dysplasia foci on the background of metaplastic epithelium. An exception is tokokishechnaya metaplasia, which may be an indirect sign of the development of highly differentiated epithelium in response to gastroesophageal or duodenogastroesophageal reflux.

**Conclusion.** Studies have shown that there are a number of genetic features of the pathological process in patients with morphologically confirmed PB, the combination of which is more reliable and reliable assessment of the risk of neoplastic changes than individual indicators.

To date, it remains relevant to develop a marker panel that is suitable for use in clinical practice, informative for both assessing individual risk and stratifying risk groups, and useful for monitoring the effectiveness of treatment.

**Keywords:** Barrett's esophagus, genetic features

## Актуальность проблемы

Рак пищевода является серьезной клинической проблемой, так как протекает бессимптомно, в большинстве случаев, диагностируется на поздней стадии (III–IV стадия – 70%), а 5-летняя выживаемость больных не превышает 20% (IV стадия – 4%) [5].

Пищевод Баррета (ПБ) – наиболее «коварное» осложнение гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), проявляющееся трансформацией

многослойного плоского эпителия в цилиндрический тип эпителия, которая может быть переходящей метаплазией в крае эрозии или иметь стойкий характер предопухолевой патологии. Различить такие изменения морфологически практически невозможно [2, 3, 9].

Многочисленные отечественные и зарубежные работы не дают ответа на этот вопрос, а также на вопрос: является ли правомерным экстраполяция

каскада Correa на данную патологию или дебют канцерогенеза возможен на любом уровне метапластических изменений [3, 6]. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется генетическим и иммуногистохимическим маркерам каждого этапа морфологической трансформации ПБ.

Что касается частоты развития, то у лиц, не предъявляющих жалоб на симптомы рефлюкса морфологически ПБ обнаруживают не чаще, чем в 6% случаев. У лиц же, страдающих ГЭРБ – с частотой до 15%. Таким образом, статистически разница не существенна. Что именно определяет развитие этого состояния до сих пор остается неясным [4]

Существуют предрасполагающие факторы для развития ПБ. Согласно статистическим данным, заболевание чаще развивается у мужчин европейской расы, страдающих ожирением, что как следствие приводит к снижению тонуса нижнего пищевого сфинктера (НПС) и возможности гастроэзофагеальных и дуоденогастроэзофагеальных рефлюксов [8].

Однако, остается неясным когда метапластические изменения эпителия носят проходящий характер и регрессируют на фоне проводимого лечения, а когда заболевание имеет тенденцию к канцерогенному прогрессированию. Общепринято, что важным фактором риска неопластической прогрессии при ПБ является наследственность и длина сегмента [4, 8,12].

Отсутствие надежных эпидемиологических и клинко-морфологических критериев или маркеров оценки вероятности развития неопластической прогрессии – развития аденокарциномы пищевода (АКП) существенно осложняет наблюдение

за пациентами, так как остается неопределенной группа риска, в связи с чем поиск биологических маркеров позволит индивидуализировать схему наблюдения и лечения [11, 15].

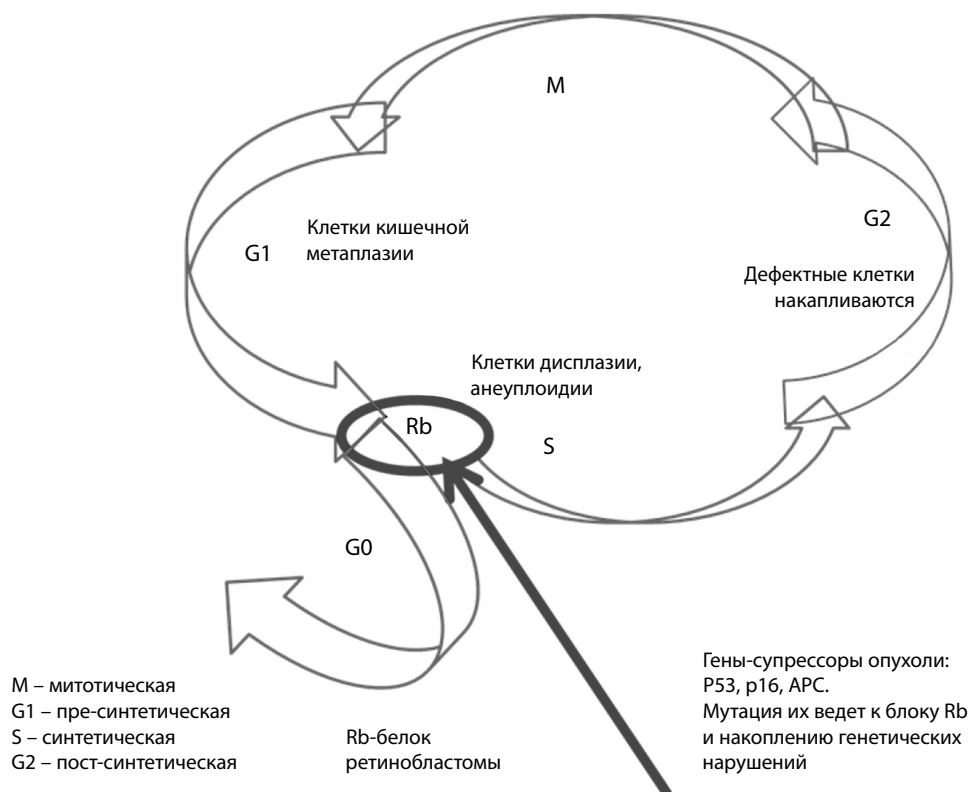
Дисплазия эпителия – единственный в настоящее время значимый показатель повышенного риска развития АКП, который сегодня используется на практике. Однако, неясным остается канцерогенный потенциал метаплазированного эпителия без развития дисплазии [3].

По данным мировой литературы уже в метаплазированном эпителии ПБ имеют место нарушения клеточного цикла, потеря контроля над клеточной пролиферацией: большинство клеток находятся в фазе G1, а в дисплазированном в S-фазе, при этом увеличивается пропорция клеток с анеуплоидией [7, 15, 16] рисунок 1.

Наиболее значимыми факторами контроля клеточного цикла, по данным современной литературы, являются: гены p53, p63 и Ki 67, а также протеомика и транскриптомика кодируемых ими процессов [7, 13].

p53 – белок, является продуктом гена-супрессора опухоли TP53, который часто называют «стражем генома», отвечает за регуляцию клеточной транскрипции и активацию апоптоза. Экспрессируется во всех клетках организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата, белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется и запускает транскрипцию группы генов, результатом активации которых является остановка клеточного цикла и репликации ДНК поврежденной клетки, а при сильном стрессовом сигнале запуск системы апоптоза. Так происходит удаление из пула реплицирующихся клеток тех, которые являются

**Рисунок 1.**  
Клеточный цикл.



потенциально онкогенными. Определение в клетках активного p53 опосредованно свидетельствует о наличии повреждения ДНК клетки [10].

Белок p63 принадлежит к тому же семейству, что и p53 опухолевых супрессорных генов, экспрессируется в ядрах пролиферирующих базальных клеток различных видов эпителия, и контролирует их дифференцировку [1, 7, 14].

Ki 67 – ядерный антиген, впервые описан Gerdes и соавторами в 1983 году. Ki-67 – димерная мо-

лекула, которая является специфичным и оптимальным для широкого использования маркером пролиферации. Однако, конкретная роль этого протеина в процессе клеточного деления до сих пор точно не выяснена [3, 6].

Все описанные изменения генов могут быть определены иммуногистохимическим методом.

**Цель исследования:** оценить генетические особенности патологического процесса у пациентов с морфологически подтвержденным ПБ.

## Материалы и методы

Динамическое наблюдение и лечение пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом пищевод Баррета (ПБ) проводилось в Многопрофильном медицинском центре банка России г. Москвы в период с 2014 по 2019 г. В исследование были включены 52 пациента. Среди них мужчин – 33 (63,4%) и женщин – 19 (36,5%) в возрасте от 28 до 70 лет, пик заболеваемости приходился преимущественно в возрастной промежуток от 50–71 года. В результате в момент проведения исследования были выявлены морфологические типы эпителия ПБ, представленные в таблице 1.

Диагноз ПБ выставлялся на основании пражских критериев и морфологического исследования биопсийного материала. Короткий сегмент до 3 см диагностирован у 43 (82,6%), длинный сегмент больше 3 см у 9 (17,3%).

Эндоскопическое исследование пациентов проводилось с помощью эндоскопической аппаратуры фирмы «OLYMPUS»: видеоэндоскопическое оборудование EVIS EXERA-II и III. Первичный осмотр проводился в белом осмотре с использованием Сиэтлского протокола забора биопсии. С целью уточняющей диагностики применялось витальное окрашивание слизистой: метиленовый синий 0,5%, раствор Люголя 1% и уксусная кислота 1,5%, осмотр в режимах ZOOM- и NBI-, а также по показаниям сочетание методик с прицельным забором биопсийного материала. Проводилось цитологическое и гистологическое исследование биопсийного

материала, которое включало: окрашивание гематоксилин-эозин и альциановым синим pH 2,5, ШИК-реакцию, увеличение  $\times 5$ ;  $\times 10$ ;  $\times 20$ ;  $\times 300$ .

Иммуногистохимическое исследование проводилось на специальных стеклах поверхность которых обработана меченым атителом, в случае возникновения реакции антитело с молекулами антигена реакция расценивалась как положительная, при отсутствии молекул-антигенов в биопсийном материале реакции не было [11, 12, 13].

Были получены данные о мутации p53 и p63 как качественный показатель.

Ki 67 определялся в процентном отношении к общему числу клеток. Норма данного показателя неоднозначна. Широко изучены данные среди рака молочной железы, где предельно допустимым процент ядерной пролиферативной активности составляет 15% [10,15].

Для пищевода Баррета при кишечной метаплазии нормы Ki 67 в литературе не описаны [13]. Однако значения показателя в нашей работе статистически распределились на  $<30\%$ , как относительная величина статистического анализа.

Всем пациентам проводилась консервативная терапия, включающая ингибиторы протонной помпы, цитопротекторы и прокинетики [4].

При проведении эндоскопического внутрипросветного лечения методом выбора была аргонплазменная коагуляция (АПК). С этой целью использовался аппарат ERBE

## Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования были выявлены следующие показатели, представленные в таблице 2.

Согласно полученным данным показатель экспрессии Ki-67 в группе кардиального типа встречался у большинства пациентов до 30% (в среднем  $21,4 \pm 8,6$ ), но у 2 из 8 пациентов показатель экспрессии превысил 30%, что несвойственно для данной

группы. При этом у этих же пациентов были выявлены мутации генов p53 и p63, что свидетельствует о повышенной скорости пролиферации, снижении апоптоза и нарушении процессов дифференцировки. Углубленный ретроспективный анализ показал, что по данным предыдущих биопсий, у этих пациентов ранее выявлялись фокусы дисплазии легкой степени на фоне толстокишечной

Тип эпителия	Число пациентов	%
кардиальный	8	15,3
тонкокишечный	25	48
толстокишечный без дисплазии	17	32,6
толстокишечный с фокусами дисплазии легкой степени	2	3,8
Всего	52	100

Таблица 1.  
Морфологические типы эпителия пациентов с ПБ, включенных в исследование.

Таблица 2.  
Показатели биологических маркеров, выявленные в результате иммуногистохимического исследования биопсийного материала.

Тип эпителия	Число пациентов	Мутация р53	Мутация р63	экспрессия Ki-67	
				<30%	>30%
кардиальный	8	2	2	6	2
тонкокишечный	25	13	11	25	0
толстокишечный без дисплазии	17	16	16	0	17
толстокишечный с фокусами дисплазии легкой степени	2	2	2	0	2
Всего	52	33	31	31	21

метаплазии, которые регрессировали после проведения консервативной терапии.

По нашему мнению, учитывая выявленные генетические особенности патологического процесса, такой группе пациентов необходим индивидуальный подход динамического наблюдения.

При тонкокишечной метаплазии у всех пациентов экспрессия Ki-67 была представлена показателями до 30% (в среднем 27,8±2,2%), хотя у 13 имела место мутация гена р53, а у 11- мутация гена р63. Можно предположить, что данный тип эпителия наиболее стабилен, что и было подтверждено в процессе дальнейшего динамического наблюдения. В течение всего времени наблюдения морфологические изменения сохранялись на прежнем уровне. Данной группе пациентов необходимо наблюдение согласно клиническим рекомендациям.

При толстокишечном типе было отмечено увеличение экспрессии Ki-67 до 50–60% (в среднем 54,2±5,8%) у всех пациентов. При этом так же отмечалась мутация генов р53 и р63, что является фактором риска развития дисплазии. Такой группе пациентов необходимо проведение ЭГДС 1 раза в год.

В исследуемой группе пациентов фокусы дисплазии слабой степени на фоне толстокишечной метаплазии были выявлены только у 2-х пациентов. При этом экспрессия Ki-67 увеличилась до 80% (в среднем 78±1,2%), что сочеталось с мутация р53 и р63 в обоих случаях. Данные показатели были расценены, как пограничное состояние с возможным переходом в тяжелую дисплазию. Что являлось показанием к проведению эндоскопического внутрипросветного лечения – АПК.

После проведения АПК и курса консервативной терапии у обоих пациентов морфологически определялась толстокишечная метаплазия без фокусов дисплазии и пациенты наблюдались в сроки соответственно клиническим рекомендациям.

Выводы

1. Мутация генов р 53, отвечающего за регуляцию клеточной транскрипции и активацию апоптоза и гена р63, ответственного за дифференцировку клеток встречается при всех морфологических типах ПБ, при этом число мутаций увеличивается по мере прогрессирования метастатических изменений в соответствии с каскадом Correa.

2. Сочетание мутаций генов р53 и р63 практически в равных соотношениях, свидетельствует

о параллельных процессах нарушения пролиферации и дифференцировки клеток.

3. Экспрессия Ki-67 увеличивается от кардиального типа эпителия в сегменте к выявлению фокусов дисплазии на фоне метаплазированного эпителия. Исключением является тококишечная метаплазия, что может являться косвенным признаком развития высокодифференцированного эпителия в ответ на гастроэзофагеальный или дуоденогастроэзофагеальный рефлюкс.

Заключение

Проведенные исследования, показали, что существует целый ряд генетических особенностей патологического процесса у пациентов с морфологически подтвержденным ПБ, сочетание которых дает большую достоверность и надежность оценки риска неопластических изменений, чем отдельно взятые показатели.

На сегодняшний день остается актуальной разработка панели маркеров, пригодной к использованию в условиях клинической практики, информативной как для оценки индивидуального риска, так и для стратификации групп риска, а также полезной для контроля эффективности проведенного лечения.

## Литература | References

1. Воротеляк Е.А., Чермных Э.С., Ткаченко С.Б. и соавт. Экспрессия и функция гена р63 в эпителиальных клетках // Известия РАИ. Серия биологическая. – 2007. – № 4. – С. 389–393.  
*Vorotelyak EA, Chermnykh ES, Tkachenko SB et al. Ekspressiya i funktsiya gena r63 v epitalial'nykh kletkakh [Expression and function of the P63 gene in epithelial cells]. Izvestiya RAI. Seriya biologicheskaya. 2007; (4): 389–93.*
2. Зайратьянц О.В., Маев И.В., Смольяникова В.А. и соавт. Патологическая анатомия пищевода Баррета // Архив патологии. – 2011. – № 3. – С. 21–26.  
*Zairatyants OV, Maev IV, Smolennikov V et al. Patologicheskaya anatomiya pishchevoda Barreta [Pathological anatomy of Barrett's esophagus] Arkhiv patologii. 2011; (3): 21–6.*
3. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С. Пищевод Баррета. – Т. 2. – М: Шико, 2011. – 624 с.  
*Ivashkin VT, Mayev IV, Trukhmanov AS. Pishchevod Barreta [Barret's Esophagus]. Vol. 2. M: Shiko Publ., 2011. 624 p.*
4. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2017. – № 27 (4). – С. 75–95.  
*Ivashkin V.T., Maev I.V., Trukhmanov A.S. Klinicheskiye rekomendatsii Rossiyskoy gastroenterologicheskoy assotsiatsii po diagnostike i lecheniyu gastroezofageal'noy refluksnoy bolezni [Clinical recommendations of the Russian gastroenterological Association for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease]. Rosciyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii. 2017; 27(4): 75–95.*
5. Кардашева С.С., Коган Е.А., Ивашкин В.Т. и соавт. Развитие дисплазии и рака при эзофагите и пищеводе Баррета: клинко-морфологические параллели // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – № 3, 2006. – С 4–11.  
*Kardasheva SS, Kogan EA, Ivashkin VT et al. Razvitiye displazii i raka pri ezofagite i pishchevode Barreta: kliniko-morfologicheskiye paralleli [Development of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett's esophagus: clinical and morphological parallels]. Rosciyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii. 2006; (3): 4–11.*
6. Пирогов С.С., Карселадзе А.И. Молекулярно-генетические исследования в диагностике и оценке неопластической прогрессии пищевода Баррета // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 1. – С. 85–94.  
*Pirogov SS, Karseladze AI. Molekulyarno-geneticheskiye issledovaniya v diagnostike i otsenke neoplasticheskoy progressii pishchevoda Barreta [Molecular genetic studies in the diagnosis and evaluation of neoplastic progression of Barrett's esophagus]. Sibirskiy onkologicheskii zhurnal. 2008; (1): 85–94.*
7. Andrew M., William M, Watthew D. et al. Genetic and epigenetic alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015; 44 (2): 473–489. doi:10.1016/j.gtc.2015.02.015.
8. Hiroshi N, Kelly W. et al. Mechanisms of Barrett's esophagus: intestinal differentiation, stem cells, and tissue models. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015; 29 (1): 3–16.
9. Findlay JM, Middleton MR, Tomlinson I. Genetic biomarkers of Barrett's esophagus susceptibility and progression to dysplasia and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2016; 61: 25–38.
10. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW. et al. Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut.* 2013; 62: 1676–83.
11. Matthew J, Whitson M, Gary W. et al. Predictors of progression to high-grade dysplasia or adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015; 44(2): 299–315.
12. Sherma AN, Coppola D. Surgical and molecular pathology of Barrett esophagus. *Cancer Control.* 2015; 22 (2): 177–85.
13. Van Dekken H, Hop WC, Tilanus HW et al. Immunohistochemical evaluation of a panel of tumor cell markers during malignant progression in Barrett esophagus. *Oncology.* 2008; 130 (5): 745–53.
14. Watanabe H, Ma Q, Peng S et al. SOX2 and p63 colocalize at genetic loci in squamous cell carcinomas. *J Clin Inves.* 2014; 124 (4): 1636–45.
15. Weaver JM, Ross-Innes CS, Shannon N et al. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet.* 2014; 46 (8): 837–43.
16. Weronica E., Levine D.M., D'Amato M et al. Germline genetic contributions to risk for esophageal adenocarcinoma, Barrett's esophagus, and gastroesophageal reflux. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1711–8.