

## Zastosowanie roztworu Lugola w diagnostyce zmian chorobowych przełyku o wysokim ryzyku nowotworzenia

Application of Lugol's solution in diagnostics of oesophageal diseases with high risk of malignancy



Janusz Włodarczyk

Oddział Chirurgii Klatki Piersiowej, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2008; 5 (1): 38–42

### Streszczenie

**Wstęp:** Złe rokowanie pacjentów chorych na raka płaskonabłonkowego przełyku i złącza przełykowo-żołądkowego zmusza do zastosowania metod umożliwiających wczesne wykrycie stanów wysokiego ryzyka nowotworzenia.

**Cel:** Endoskopia z użyciem roztworu Lugola jest stosowana w diagnostyce wczesnej postaci raka płaskonabłonkowego przełyku. Celem pracy jest analiza wartości endoskopii rozszerzonej o barwienie roztworem Lugola w diagnostyce zmian chorobowych wysokiego ryzyka nowotworzenia w przełyku.

**Materiał i metody:** Do badania zakwalifikowano 96 chorych. Metoda wykorzystuje reakcję pomiędzy glikogenem zawartym w nabłonku przełyku a jodem w roztworze Lugola. Oceny endoskopowej dokonywano przed podaniem roztworu Lugola, następnie oceniano granicę przełykowo-żołądkową i wybarwienie błony śluzowej po podaniu roztworu Lugola. Biopsji dokonywano z miejsc wybarwionych i niewybarwionych.

**Wyniki:** Metodę cechuje wysoka czułość (83%) i specyficzność (63%), a stosunek pól niewybarwionych do wybarwionych jest statystycznie znamienne. Dzięki prawidłowej ocenie granicy przełykowo-żołądkowej metoda daje możliwość postawienia prawidłowej diagnozy przełyku Barretta. Choć nie zdiagnozowano postaci wczesnej raka przełyku, to w 1 przypadku stwierdzono dysplazję dużego stopnia powiązaną z zapaleniem błony śluzowej przełyku III stopnia.

**Wnioski:** W przeprowadzonym badaniu nie wykryto wczesnej postaci raka przełyku, jednak badanie endoskopowe rozszerzone o barwienie roztworem Lugola stanowi czułą metodę diagnostyki zmian chorobowych o wysokim ryzyku nowotworzenia.

**Słowa kluczowe:** choroba refluksowa przełyku, Lugol, dysplazja, przełyk Barretta.

### Abstract

**Background:** The prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus and oesophagogastric junction is poor and demands application of methods which enable early identification of high risk states of cancer development.

**Aim:** Endoscopic examination followed by Lugol's solution staining is used in the diagnostics of early squamous cell carcinoma of the oesophagus. The study describes the use of this method for assessment of effectiveness in diseases of the oesophagus with a high risk of malignancy.

**Material and methods:** The study was conducted with 98 patients. The method makes use of a reaction between glycogen, contained in oesophageal epithelium, and the iodine in Lugol's solution. Before applying Lugol's solution an endoscopic assessment was made. Subsequently the oesophagogastric border and staining of mucosa after application of Lugol's solution were evaluated. Biopsy was carried out from the stained and unstained places.

**Results:** High sensitivity (83%) and specificity (63%) are characteristic of this method and the ratio of the stained and unstained places is statistically significant. Thanks to the proper evaluation of the oesophagogastric junction the method enables one to make a correct diagnosis of Barrett's oesophagus. Although early oesophageal cancer was not detected, in one case high grade dysplasia connected with 3<sup>rd</sup> degree oesophagitis was diagnosed.

**Conclusions:** Early oesophageal cancer was not detected in the carried out examination. However, the endoscopic screening, combined with Lugol's dye staining, is a sensitive diagnostic method for detecting abnormalities of a high risk of cancer development.

**Key words:** reflux oesophagitis, Lugol, dysplasia, Barrett's oesophagus.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Janusz Włodarczyk, Oddział Chirurgii Klatki Piersiowej, 31-202 Kraków, ul. Prądnicza 80, tel. +48 12 614 20 28, faks +48 12 614 34 31, e-mail: j.wlodarczyk@szpitaljp2.krakow.pl

## Wstęp

Refluksowe zapalenie przełyku jest najczęściej występującym schorzeniem górnego odcinka przewodu pokarmowego. Częstość jego występowania jest różnie szacowana przez autorów i waha się od 4500 do 8000 na 100 000 [1, 2]. Choroba refluksowa cechuje się niespecyficznymi objawami, dlatego też może maskować rozwój stanów przedrakowych, jak również samej choroby nowotworowej okolicy złącza przełykowo-żołądkowego. Wprowadzenie metod barwienia roztworem Lugola w trakcie endoskopii górnego odcinka przewodu pokarmowego może pomóc we wczesnym ich rozpoznaniu. Po raz pierwszy metoda ta została zastosowana przez Schillera w 1933 roku w diagnostyce raka szyjki macicy, natomiast Voegeli wykorzystał ją w 1966 roku w diagnostyce zmian chorobowych przełyku [3, 4].

## Cel pracy

Celem pracy jest porównanie skuteczności endoskopii klasycznej z endoskopią rozszerzoną o barwienie roztworem Lugola w stanach ryzyka wystąpienia nowotworu złośliwego przełyku. Do badania zakwalifikowano pacjentów, u których podejrzewano chorobę refluksową przełyku, a endoskopia była 1. wykonanym badaniem diagnostycznym. Jako badanie referencyjne przyjęto rozpoznanie mikroskopowe, które było oceniane przez 1 doświadczonego patologa.

## Materiał i metody

### Pacjenci

Badaniu poddano 96 chorych, u których na podstawie wywiadu podejrzewano chorobę refluksową, a endoskopia została przeprowadzona jako pierwsze badanie diagnostyczne. W analizowanej grupie było 68 mężczyzn i 28 kobiet w wieku od 19 do 89 lat, średnio 48,6 roku, których poddano endoskopii rozszerzonej o barwienie roztworem Lugola.

### Kryteria endoskopowe

U chorych wykonywano standardową endoskopię, dokonując oceny stanu zapalnego błony śluzowej przełyku, wg podziału Savary'ego-Millera [5], a następnie dokonywano jej barwienia 3-procentowym roztworem Lugola (10,0 jodu potasowego rozpuszczono w 100–200 ml wody destylowanej, następnie dodano 5,0 jodu, 225,0 glicerolu i roztwór uzupełniono do 500,0 ml destylowaną wodą. Do roztworu dodano 0,2-molarny bufor octanowy o pH 4,0 w stosunku objętościowym 1: 1). W ocenie wybarwienia błony śluzowej przyjęto podział wg Misumi i wsp. [6]. W badaniu wykorzystuje się reakcję jodu z glikogenem, który jest zawarty między nabłonkiem a warstwą kolczystą. W stanach chorobowych błona śluzowa staje się cienka i ma ograniczoną wysokość warstwy kolczystej, w efekcie czego spada zawartość glikogenu, a miejsca te barwią się słabo lub nierównomiernie.

## Technika badania endoskopowego

Badanie endoskopowe przeprowadzano po znieczuleniu miejscowym gardła i dożylniej sedacji, układając chorego na lewym boku. Endoskop wprowadzano w okolicę złącza przełykowo-żołądkowego i dokonywano oceny makroskopowej błony śluzowej przełyku oraz identyfikacji granicy przełykowo-żołądkowej, następnie wycofywano endoskop, rozpylając 10–15 ml 3-procentowego roztworu Lugola. Do 5 min obserwowano zabarwienie błony śluzowej przełyku. Przed pobraniem biopłatów ustalano ponownie granicę przełykowo-żołądkową (ang. *esophagogastric muscular junction*, EGJ) następnie dokonywano oceny linii Z (ang. *squamocolumnar mucosal junction*, SCJ) z oceną drobnych naczyń stanowiących jej górną granicę. Biopsji dokonywano ok. 2 cm od wyznaczonej granicy [7, 8]. Biopłaty pobierano z miejsc całkowicie wybarwionych, o dużej różnorodności wybarwienia oraz niewybarwionych. Weryfikację histopatologiczną porównano z oceną makroskopową i stopniem wybarwienia. Z błony śluzowej pobierano od 3 do 10 biopłatów. Przyjęto, że z miejsc całkowicie wybarwionych pobierano od 3 do 4 wycinków, natomiast z obszarów różnorodnie wybarwionych od 3 do 10. Biopsję wykonywano 2 technikami: „wysunięcie i zamknięcie” oraz „obrót i ssanie” [9]. Wszystkie biopłaty były utrwalone w formalinie.

Oceny endoskopowej przełyku dokonywano w odległości od 2 do 18 cm od wyznaczonej granicy przełykowo-żołądkowej. Czas badania wynosił od 15 do 25 minut. Oceny endoskopowej dokonywał jeden endoskopista.

### Kryteria mikroskopowe

Oceny biopłatów dokonywał 1 doświadczony patomorfolog. Materiał pobrany w czasie biopsji stanowiły wycinki błony śluzowej utrwalone w formalinie i oceniane w mikroskopie świetlnym w postaci preparatów parafinowych. Zmiany zapalne w obrazie mikroskopowym zostały sklasyfikowane na podstawie następujących cech: zagęszczenia naczyń kapilarnych, nacieków limfocytarnych i leukocytarnych, ziarninowania, martwicy oraz wysokości nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Do sklasyfikowania zmian zapalnych wykorzystano klasyfikację Ismaila-Beigiego i wsp. [10], w przełyku Barretta posłużono się klasyfikacją Paulla i wsp. [11] oraz podziałem Bocha i wsp. [12], natomiast dysplazję definiowano wg definicji WHO [13].

### Analiza statystyczna

W analizie statystycznej posłużono się dwudzielnym testem  $\chi^2$ . Wartości p mniejsze od 0,05 uznano za statystycznie znamienne.

### Wyniki

W badanej grupie pacjentów podstawowym objawem było pieczenie za mostkiem, które dotyczyło 71 (73,9%) chorych, zaś pieczenie w nadbrzuszu wystąpiło u 55 (57,3%) (tab. I). Wśród przebadanych osób podczas endoskopii klasycznej u 22 (22,9%) nie stwierdzono zmian w zakresie błony

**Tab. I.** Zestawienie objawów klinicznych w stosunku do badania mikroskopowego

Rozkład chorych wg badania mikroskopowego	Norma 12 (12,5%)	I 32 (33,0%)	II 19 (19,2%)	III 21 (21,8%)	P.B. 13 (13,5%)	Razem 96 (100%)
<b>objawy kliniczne</b>						
Pieczenie za mostkiem	7 (7,2%)	20 (20,2%)	20 (20,2%)	14 (14,58%)	10 (10,4%)	71 (73,9%)
Pieczenie w nadbrzuszu	5 (5,1%)	15 (15,1%)	15 (15,1%)	12 (12,5%)	8 (8,3%)	55 (57,3%)
Ból za mostkiem	5 (5,1%)	10 (10,4%)	12 (12,5%)	12 (12,5%)	8 (8,3%)	47 (48,9%)
Odbijanie	2 (2%)	12 (12,5%)	10 (10,4%)	5 (5,1%)	2 (2%)	31 (32,3%)
Bóle w nadbrzuszu	2 (2%)	3 (3,1%)	5 (5,1%)	5 (5,1%)	3 (3,1%)	18 (18,7%)

I, II, III – chorzy z pierwszym, drugim i trzecim stopniem zapalenia błony śluzowej przełyku w badaniu mikroskopowym; P.B. – przełyk Barretta

**Tab. II.** Porównanie endoskopii klasycznej i rozszerzonej o barwienie roztworem Lugola, zweryfikowanych badaniem mikroskopowym

Badanie histopatologiczne	Endoskopia standardowa	Endoskopia + płyn Lugola	
		pola wybarwione	pola niewybarwione
Norma 13 (13,5%)	22 (22,9%)	11 (11,4%)	2 (2%)
I 33 (34,4)	25 (26,1%)	7 (7,3%)	26 (27%)
II 23 (24,0%)	28 (29,2%)	3 (3,1%)	20 (21%)
III 27 (28,1%)	16 (16,7%) + 5 (5,1%) st. IV (21,8%)	27 (28,1%)	–
		21 (21,8%)	75 (78,1%)
		razem 96 (100%)	

I, II, III – pierwszy, drugi i trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku w badaniu mikroskopowym oraz w endoskopii klasycznej; IV – czwarty stopień zapalenia błony śluzowej przełyku oceniony w endoskopii klasycznej

śluzowej, u 25 (26,1%) stwierdzono zapalenie I stopnia, u 28 (29,2%) stopnia II, u 16 (16,7%) III, a u 5 (5,1%) IV stopnia. U 1 (1%) chorego stwierdzono cechy przebytego krwawienia oraz u 1 (1%) zwężenie z brakiem możliwości przejścia do dalszej części przewodu pokarmowego. W badaniu rozszerzonym o barwienie roztworem Lugola stwierdzono całkowite wybarwienie błony śluzowej u 21 (21,8%) chorych, słabe i nierównomierne uzyskano u 20 (21%), słabe i równomierne u 20 (21%), natomiast brak wybarwienia u 35 (36,1%) pacjentów. Jako badanie referencyjne przyjęto analizę mikroskopową biopatów błony śluzowej przełyku pobranych w trakcie endoskopii. Oceny mikroskopowej dokonywano w oparciu o podział Ismaila-Beigiego i wsp. [10]. W 12 (12,5%) przypadkach nie stwierdzono zmian w błonie śluzowej przełyku, w 32 (33,0%) stwierdzono I stopień zapalenia, w 19 (19,2%) II, w 21 (21,8%) III (tab. II), w 13 (13,5%) rozpoznano przełyk Barretta (tab. III) oraz w 7 (7%) dysplazję (w 6 stopnia mniejszego i w 1 stopnia większego) (tab. IV).

Podczas przeprowadzonych badań wykonano 429 biopsji (ryc. 1).

Czułość badania wyniosła 84%, specyficzność 79%, a skuteczność 85%. Stosunek pól niewybarwionych do wybar-

**Tab. III.** Zestawienie wyników badania mikroskopowego oraz endoskopii klasycznej i rozszerzonej o barwienie roztworem Lugola w grupie chorych z przełykiem Barretta

Badanie histopatologiczne	Endoskopia standardowa	Endoskopia + płyn Lugola
N + P.B. 1	N	+
I + P.B. 1	N	+
II + P.B. 3	I, II, II	+
II + P.B. + d. st. m. 1	II	+
III + P.B. 5	II, II, III, III, III	+
III + P.B. + d. st. m. 1	III	
Razem 13		

N – prawidłowa błona śluzowa przełyku; N + P.B. – prawidłowa błona śluzowa z rozpoznaniem przełykiem Barretta; I, II, III – pierwszy, drugi, trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku; I + P.B. – pierwszy stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta; I + P.B. + d. st. m. – pierwszy stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta i dysplazją stopnia małego; II + P.B. + d. st. m. – drugi stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta i dysplazją stopnia małego; III + P.B. + d. st. m. – trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta i dysplazją stopnia małego; + – brak wybarwienia błony śluzowej z prawidłowo wyznaczoną granicą przełykowo-żółtkową

**Tab. IV.** Rozkład dysplazji w badanej grupie chorych zweryfikowanej badaniem mikroskopowym

Badanie histopatologiczne	Endoskopia standardowa	Endoskopia + płyn Lugola
II + d. st. m. 1	N	+
II + P.B. + d. st. m. 1	N, I, II, II	+
III d. st. d. 1	III	+
III d. st. m. 3	III, III, III	+
III + P.B. + d. st. m. 1	III	+
Razem 7		

N – prawidłowa błona śluzowa przełyku; I, II, III – pierwszy, drugi i trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku; II + d. st. m. – drugi stopień zapalenia błony śluzowej z dysplazją stopnia małego; II + P.B. + d. st. m. – drugi stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta i dysplazją stopnia małego; III d. st. d. – trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z dysplazją stopnia dużego; III + P.B. + d. st. m. – trzeci stopień zapalenia błony śluzowej przełyku z przełykiem Barretta i dysplazją stopnia małego; + – brak wybarwienia błony śluzowej przełyku z prawidłowo wyznaczoną granicą przełykowo-żołądkową

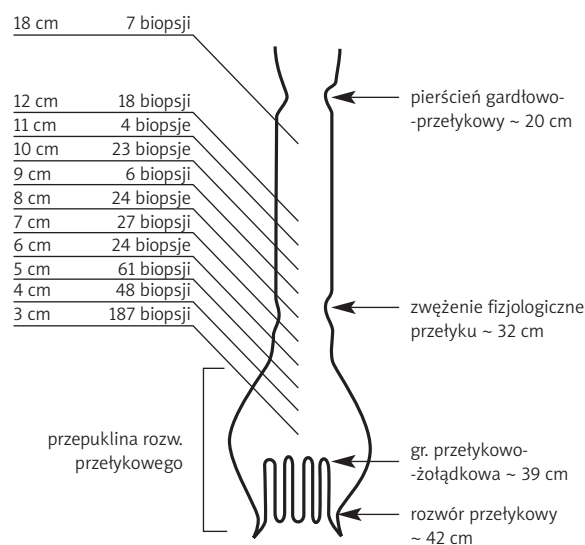
wionych zweryfikowanych mikroskopowo oceniono testem  $\chi^2$ , uzyskując znamienność statystyczną  $p=0,45$ .

## Dyskusja

Rak płaskonabłonkowy oraz gruczolowy przełyku należą do najgorzej rokujących nowotworów przewodu pokarmowego [14]. Dlatego wykrycie „wczesnych” postaci lub stanów przednowotworowych jest szczególnie ważne, gdyż jest szansą na poprawę przeżycia chorych. Klasyfikacja endoskopowa nie zawsze jest w stanie sprostać tym wymaganiom, natomiast rozszerzenie jej o barwienie roztworem Lugola pokazuje jej dużą skuteczność w diagnostyce zmian chorobowych przełyku [15].

Metoda ta wykorzystuje reakcję zachodzącą między jodem a glikogenem rozmieszczonym w warstwie kolczystej nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Inoue i wsp. [15] wyróżniają 2 typy wybarwienia: typ I, w którym błona śluzowa wybarwia się na kolor ciemnobrązowy, co jest stanem prawidłowym, oraz typ II o nierównomiernym wybarwieniu (*inconstant staining*). Typ ten, przyjmując jasny odcień wybarwienia, może być związany ze stanami zapalnymi błony śluzowej oraz z dysplazją stopnia małego. Natomiast gdy kolor wybarwienia przybiera odcień żółty lub czerwony, to zmiana może wiązać się z dysplazją lub rakiem. Reakcja taka jest możliwa, gdyż w stanach chorobowych ilość glikogenu zmniejsza się, na skutek czego zmienia się wybarwienie błony śluzowej przełyku od miejsc słabo wybarwionych do zupełnego braku jej wybarwienia [3, 4].

Przełyk Barretta stwierdzono u 13 chorych (13%), z czego w 2 przypadkach wystąpił on z towarzyszącą dysplazją stopnia mniejszego. Aktualnie definiuje się go jako każdą długość metaplastyki występującą w przełyku [8]. Kryteria diagnostyki pozostają bardzo ważne, gdyż ocenia się, że nieprawidłowa diagnoza w rutynowej endoskopii może dochodzić nawet do 80% [16]. Dlatego rekomenduje się



**Ryc. 1.** Rozkład biopsji błony śluzowej przełyku w stosunku do granicy przełykowo-żołądkowej

wykonanie biopsji po identyfikacji granicy przełykowo-żołądkowej, a następnie oceny linii Z i jej górnej granicy, która jest wyznaczona przez drobne, palisadowo ułożone naczynia krwionośne [8, 16–18]. Tak zidentyfikowana granica pozwala na wykonanie prawidłowej biopsji. Jednak w trakcie wykonywania klasycznej endoskopii naczynia te nie zawsze mogą zostać zidentyfikowane, co wiąże się zarówno z ich małym kalibrem, możliwością mechanicznego uszkodzenia, jak też zatarcia obrazu przez toczący się proces chorobowy w tej okolicy. Zastosowanie endoskopii z użyciem roztworu Lugola ułatwia prawidłową jej identyfikację, gdyż nabłonek metaplastyczny nie zawiera glikogenu, a w badaniu jest on uwidoczniiony w postaci palczastych wypustek lub przemieszczonego segmentu w stosunku do wybarwionego nabłonka płaskiego przełyku. Wydaje się, że obiecującym badaniem, które może poprawić zarówno diagnostykę przełyku Barretta, jak i dokładną identyfikację stanów zagrażających nowotworzeniu (dysplazję), jest NBI (ang. *narrow-band imaging*). Metoda ta pozwala na dokładną identyfikację drobnych naczyń z wykorzystaniem wiązki światła o długości 415 i 540 nm, docierając w głąb błony śluzowej i pokazując dystrybucję naczyń w określonej strefie metaplastyki [19].

Dysplazja wystąpiła u 7% badanej grupy chorych. W przeprowadzonej endoskopii z roztworem Lugola w 85 przypadkach stwierdzono zróżnicowanie wybarwienia, które u 6 chorych okazały się dysplazją stopnia małego, a u 1 dysplazją stopnia dużego. Zmiany dysplastyczne były zlokalizowane w 2 przypadkach w zmienionej zapalnie błonie śluzowej ocenionej mikroskopowo jako II stopień zaawansowania oraz w 5 przypadkach jako III. Wielu autorów [20–22] podkreśla, że występujące wczesne zmiany, jak dysplazja i postać raka wczesnego, mogą być związane z toczącym się procesem zapalnym w przełyku. Także Mandard i wsp. [23] uważają zapalenie przełyku za stan poprzedzający wystąpienie raka

płaskonabłonkowego, czego potwierdzeniem jest występowanie mutacji p53 zarówno w zapaleniu, jak i w raku. Autor wnioskuje, że proces powiązania zapalenia przełyku i raka przełyku ma konsekwencje nie tylko kliniczno-patologiczne, ale również genetyczne. Freitag i wsp. [24], w odróżnieniu od wyżej wymienionych autorów, podają występowanie dysplazji w zmienionej zapalnie błonie śluzowej w 1 przypadku, natomiast w 7 (w tym u 4 dysplazja stopnia dużego) dotyczyła chorych z prawidłowo wybarwioną błoną śluzową w endoskopii standardowej, a w rozszerzonej o barwienie roztworem Lugola nie stwierdzono cech jej wybarwienia. Autor ten ponadto stwierdza, że niewybarwione pola są 7-krotnie częściej narażone na wystąpienie dysplazji niż wybarwione prawidłowo.

Wskaźniki występowania dysplazji wahają się od 7% do 18%, a stopień ich powtarzalności w badaniu endoskopowym potwierdzonym histopatologicznie wynosi ok. 70% [25]. W 2 (16%) przypadkach dysplazję stopnia małego stwierdzono w przełyku Barretta. W doniesieniach innych autorów wskaźniki te wahały się od 14% do 36% [26, 27]. Dysplazja stanowi jeden ze wskaźników grupy wysokiego ryzyka rozwoju raka przełyku. Takubo i wsp. [28] zaobserwowali, że chociaż ciągłość obszarów dysplastycznych z obszarami nowotworowymi nie jest zasadą, to częściej związek ten ma miejsce w dysplazji stopnia dużego. Antonioli i wsp. [29] donoszą, że u 30% badanych chorych z dysplazją wystąpił rak inwazyjny, a w 15% dotyczyło to chorych z dysplazją stopnia małego. Streitz i wsp. [30] zauważają, że stan dysplazji trwający rok może stać się przypadkiem nieoperacyjnym, a w powiązaniu jej z przełykiem Barretta w ocenie materiału pooperacyjnego stwierdzano raka inwazyjnego w 20–50% przypadków. Reid i wsp. [25] wykazują, że z miejsc objętych zaawansowaną dysplazją biopsje wykonywane zgodnie z protokołem pozwalają wykryć wczesną postać gruczolakoraka, a pacjenci z rozpoznaną dysplazją powinni zostać objęci nadzorem endoskopowym.

## Wnioski

1. W przeprowadzonej pracy nie wykryto wczesnej postaci raka przełyku, tym niemniej badanie endoskopowe rozszerzone o barwienie roztworem Lugola stanowi czułą metodę diagnostyki patologii o wysokim ryzyku wystąpienia raka przełyku.
2. Dysplazja błony śluzowej przełyku była powiązana z toczącymi się zmianami zapalnymi w błonie śluzowej przełyku.
3. Metoda ta powinna być stosowana u pacjentów podlegających stałemu nadzorowi endoskopowemu (chorzy z przełykiem Barretta i/lub dysplazją), gdyż jest skuteczna i nie wymaga w użyciu zaawansowanej technologicznie aparatury diagnostycznej.

## Piśmiennictwo

1. Brunnen PL, Karmody AM, Needham CD. Severe peptic esophagitis. *Gut* 1969; 10: 831-837.
2. Heading RC. Epidemiology of esophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 24: 33-37.
3. Schiller V. Early diagnosis of carcinoma of the cervix. *Surg Gynecol and Obstet* 1933; 56: 210-222.
4. Voegeli R. Die Schiller'sche Jod-probe in Rhamen der Oesophagus diagnostik. (Vorläufige Mitteilung). *Pract Othorinolaryngol* 1966; 28: 230-239.
5. Savary M, Miller G. L'oesophage. Manuel et atlas d'endoscopie. Solevrev, Switzerland Verlag Gassamann 1977.
6. Misumi A, Harada K, Murakami A, Arima K, Kondo H, Akagi M, Yagi Y, Ikeda T, Baba K, Kobori Y. Role of Lugol dye endoscopy in the diagnosis of early esophageal cancer. *Endoscopy* 1990; 22: 12-16.
7. McClave SA, Boyce HW Jr, Gottfried MR. Early diagnosis of columnar-lined esophagus: a new endoscopic diagnostic criterion. *Gastrointest Endosc* 1987; 33: 413-416.
8. Boyce HW. Barrett esophagus. Endoscopic findings and what to biopsy. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36 (5 Suppl): S6-S18.
9. Levine DS, Reid BJ. Endoscopic biopsy technique for acquiring larger mucosal samples. *Gastrointestinal Endosc* 1991; 37: 332-337.
10. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE 2<sup>nd</sup>. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970; 58: 163-173.
11. Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, Goyal RK. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Eng J Med* 1976; 295: 476-480.
12. Boch JA, Shields HM, Antonioli DA, Zwas F, Sawhney RA, Trier JS. Distribution of cytokeratin markers in Barrett's specialized columnar epithelium. *Gastroenterology* 1997; 112: 760-765.
13. Watanabe H, Jass JR, Sobin LH. Histological typing oesophageal and gastric tumours. In World Health Organisation. International classification of tumours 2<sup>nd</sup> ed. Berlin Springer 1990; 11-18.
14. Siewert JR, Stein HJ. Barrett's cancer: indications, extent and results of surgical resection. *Semin Surg Oncol* 1997; 13: 245-252.
15. Inoue H, Rey JF, Lightdale C. Lugol chromoendoscopy for esophageal squamous cell cancer. *Endoscopy* 2001; 33: 75-79.
16. Mueller J, Werner M, Stolte M. Barrett's esophagus: histopathologic definitions and diagnostic criteria. *World J Surg* 2004; 28: 148-154.
17. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105: 40-50.
18. Levine DS, Blount PL, Rudolph RE, Reid BJ. Safety of a systematic endoscopic biopsy protocol in patients with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1152-1157.
19. Kuznetsov K, Lambert R, Rey JF. Narrow-band imaging: potential and limitations. *Endoscopy* 2006; 38: 76-81.
20. Kitamura K, Kuwano H, Yasuda M, Sonoda K, Sumiyoshi K, Tsutsui S, Kitamura M, Sugimachi K. What is the earliest malignant lesion in the esophagus? *Cancer* 1996; 77 (8 Suppl): 1614-1619.
21. Spechler SJ. The natural history of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett esophagus. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36 (5 Suppl): 2-5.
22. Guanerei Y, Songliang Q. Endoscopic surveys in high-risk and low-risk populations for esophageal cancer in China with special reference to precursors of esophageal cancer. *Endoscopy* 1987; 19: 91-95.
23. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C, Benard S, Mandard JC. Expression of p53 protein in esophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for squamous cell carcinoma of the esophagus with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181: 153-157.
24. Freitag CP, Barros SG, Krueel CD, Putten AC, Dietz J, Gruber AC, Diehl AS, Meurer L, Breyer F, Wolf F, Vidal R, Arruda CA, Luz LP, Fagundes RB, Prolla JC. Esophageal dysplasia are detected by endoscopy with Lugol in inhabitants at risk for squamous cell carcinoma in southern Brazil. *Dis Esophagus* 1999; 12: 191-195.
25. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, Lewin K, Weinstein WM, Antonioli DA, Goldman H. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988; 19: 166-178.
26. Miros M, Kerlin P, Walker N. Only patient with dysplasia progress to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gut* 1991; 32: 1441-1446.
27. Hameeteman W, Tytgat GNJ, Houthof HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96: 1249-1256.
28. Takubo K, Tsuchiya S, Fukushi K, Shirota A, Mitomo Y. Dysplasia and reserve hyperplasia – like change in human esophagus. *Acta Pathol Jpn* 1981; 31: 999-1013.
29. Antonioli D. Esophagus. In: Henson DE, Albroes-Saavedra J (eds.). Pathology of incipient neoplasia. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1993; 64-71.
30. Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH Jr. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 383-387.