

ENDOSCOPIC, HISTOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS OF ABERRANT CRYPT FOCI (ACF)**ENDOSKOPOWE, HISTOPATOLOGICZNE I MOLEKULARNE WYKŁADNIKI ABERRANT CRYPT FOCI (ACF)**

Marek Kowalczyk¹⁾, Wiesław Pesta²⁾, Krzysztof Zinkiewicz³⁾, Agnieszka Pedrycz⁴⁾,
Krzysztof Paśnik⁵⁾, Piotr Siermontowski⁶⁾, Marcin Orłowski⁷⁾, Waldemar Kurpiewski¹⁾,
Wit Juśkiewicz¹⁾, Iwona Kowalczyk¹⁾

¹⁾ Academic Clinical Hospital in Olsztyn, Poland

¹⁾ Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Olsztynie

²⁾ The Department of General and Minimally Invasive Surgery with the Centre of Surgical Obesity Treatment, A Health Service Institution in Łęczna, Poland

²⁾ Oddział Chirurgii Ogólnej i Małoinwazyjnej z Ośrodkiem Chirurgicznego Leczenia Otyłości, Szpital ZOZ w Łęcznej

³⁾ The 2nd Department of General and Gastrointestinal Surgery and Surgical Oncology of the Alimentary Tract, Medical University in Lublin, Poland

³⁾ II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Nowotworów Układu Pokarmowego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁴⁾ Histology and Embryology Department with the Experimental Cytology Laboratory of Medical University in Lublin, Poland

⁴⁾ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

⁵⁾ General, Oncological, Metabolic and Thoracosurgery Clinic, CCH MND MMI in Warsaw, Poland

⁵⁾ Klinika Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej, Metabolicznej i Torakochirurgii CSK MON WIM w Warszawie

⁶⁾ Maritime and Hyperbaric Medicine Department, Military Institute of Medicine in Gdynia, Poland

⁶⁾ Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej Wojskowego Instytutu Medycznego w Gdyni

⁷⁾ Centrum of Diagnosis and Therapy of Digestive System's Diseases in Gdansk, Poland

⁷⁾ Centrum Diagnostyki i Leczenia Chorób Układu Pokarmowego w Gdańsku

ARTICLE INFO

Journal: PolHypRes 2013 Vol. 43 Issue 2 pp. 97 – 109

ISSN: 1734-7009

eISSN: 2084-0535

DOI: HTTP://DX.DOI.ORG/10.13006/PHR. 44.5

Pages: 13, figures: 4, tables: 0.

page www of the periodical: www.phr.net.pl

Keywords/Słowa kluczowe:

(in English): colorectal cancer, chromoendoscopy, ACF.

(in Polish): rak jelita grubego, chromoendoskopia, ACF.

Polish-English bilingual publication**Publisher**

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

ABSTRACT

(in English)

According to the Vogelstein theory, the carcinogenesis model in colorectal cancer is one of the best-characterized models of a multistep and multilevel process associated with the progression from normal colonocyte through aberrant crypt foci (ACF) and adenoma with dysplasia to invasive carcinoma. ACF are not visible in standard colonoscopy but are well identified with the use of high-magnification chromoendoscopy with methylene blue or indigo carmine staining. As compared with endoscopic images of normal crypts, ACF orifices appeared 2-3 times larger and had a thicker epithelial lining of a fissured and/or stellate shape, and, moreover, the mucosa staining in the ACF area was much more intense.

Under a microscope ACF agglomerations were noted, consisting of several to 200 intestinal glands characterised by various types of lesions (hyperplastic or dysplastic) affecting both the cyto- and histo-architecture. The distribution of ACF correlates well with adenomas and predilection area for the occurrence of polyps, as well as colorectal cancer (CRC) localization. The epidemiologic, genetic and enzymatic chance of ACF occurrence should be similar to that of adenomas and CRC, and their presence is a good predictor of future CRC development. ACF may be precursors of adenoma and colon cancer in APC and a K-ras-dependent pathways, as well as a rare pathogenetic pathway evoked by microsatellite instability (MSI) combined with DNA hypermethylation. ACF are the first morphologically identifiable (endoscopically and microscopically) precursors of colorectal cancer.

The summary in Polish on end of the publication

The summary in Russian on end of the publication

WSTĘP

Występowanie ACF u ludzi bez objawów klinicznych zaburzeń chorobowych dolnego odcinka przewodu pokarmowego narasta z wiekiem. Poniżej 40 roku życia ACF występują sporadycznie. Natomiast częściej stwierdza się ACF w okresie 40-50 r. ż., po czym liczba ich znacząco wzrasta od 50 r. ż. [1]. ACF u ludzi występują z podobną częstością u obu płci, nawet u osób z okolic o większym ryzyku wystąpienia RJG. Komórki nabłonka błony śluzowej jelita grubego, tworzące ACF produkują śluz, tak jak prawidłowe komórki jelita, jednak jest to śluz różny jakościowo. W tych stanach bowiem zwiększa się zawartość sialomucyn, natomiast zmniejszeniu ulega zawartość sulfomucyn w komórkach kubkowych nabłonka gruczołów, tworzących ACF [2]. Warto w tym miejscu nadmienić, że komórki wydzielające śluz w ACF mogą zawierać mieszaninę obu ww. związków śluzowych lub tylko jeden spośród nich, bądź też mogą być całkowicie pozbawione śluzu. Ponadto w ACF kolonocyty posiadają mniejszą liczbę mikrosomów w porównaniu z prawidłową komórką cylindryczną nabłonka błony śluzowej jelita grubego.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że ACF były po raz pierwszy opisane przez R. Bird w 1987 roku u myszy, poddanych działaniu środka mutagennego- azoxymethanu [3]. U tych myszy, w 2-3 tygodnie po podaniu mutagenu, w jelicie grubym obserwowano ogniska nieprawidłowych krypt, które błękitem metylenowym wybarwiały się ciemniej niż otaczające krypty prawidłowe, przy czym miały wyraźnie odmienne ujścia krypt i pogrubiałe obrzeża w porównaniu do niezmienionej, otaczającej te ogniska błony śluzowej.

Kinzler i Vogelstein oceniają ACF jako najwcześniej identyfikowalne morfologiczne zmiany w cyklu zdarzeń molekularno-morfologicznych, prowadzących do rozwoju raka jelita grubego [4]. ACF są zmianami heterogennymi, co m. in. powoduje, że niektóre spośród nich mogą przekształcić się w raka, podczas gdy inne utrzymują się w stanie nie zmienionym przez długi okres czasu.

Pierwszy raz ACF u ludzi były opisane w 1991 roku w resekowanych z powodu raka fragmentach jelita grubego [5].

Przy tym stwierdzono, że ludzkie ACF posiadają niemal identyczne wykładniki morfologiczne jakie obserwowano u doświadczalnych zwierząt i wyróżniają się następującymi cechami: krypty wchodzące w skład ACF są zdecydowanie szersze, natomiast przestrzeń wokół nich jest pogrubiała, błękitem metylenowym barwią się ciemniej niż krypty prawidłowe, ujścia krypt różnią się wyglądem od krypt zdrowych, w których to kryptach te ujścia są okrągłe lub owalne.

Zgodnie z teorią Vogelsteina karcinogeneza w RJG jest wieloetapowym i wielopoziomowym procesem zaburzenia regulacji dojrzewania nabłonka błony śluzowej jelita, począwszy od prawidłowej komórki macierzystej tego nabłonka, przez ogniska nieprawidłowych krypt jelitowych (ACF), następnie stadium gruczolaka/dysplazji, na gruczolakoraku kończąc [6]. Proces rozwoju RJG poprzedzają zmiany pośrednie, z których jak wiadomo z doświadczenia klinicznego, tylko niewielka część ulega transformacji złośliwej [7]. Współczesna medycyna dąży do jak najwcześniejszego wykrycia i leczenia stanów przedrakowych, którymi są ACF i niektóre polipy jelita grubego. ACF, czyli ogniska nieprawidłowych krypt jelitowych, są najwcześniej rozwijającymi się prekursorami nowotworów nabłonkowych jelita grubego. Wykrywanie zmian wczesnych i ich usuwanie podczas badania kolonoskopowego (ACF, polipy jelita grubego) może być metodą prewencyjną oraz służy do poprawy wyników leczenia, ponieważ w przypadkach raków wykrytych w okresie bezobjawowym rokowanie jest znacznie lepsze.

OBRAZ ENDOSKOPOWY ACF

ACF są niewidoczne w rutynowej kolonoskopii, natomiast dobrze identyfikowalne w chromoendoskopii, połączonej z barwieniem błony śluzowej jelita grubego, przy zastosowaniu błękitu metylenowego lub indygokarminu.

INTRODUCTION

The rate of ACF occurrence in humans without the projection of any clinical symptoms of pathological disorders in the lower part of the alimentary tract increases with age. Below the age of 40, ACF occurrence is sporadic. It is more common in the period between 40-50 years of age, and rapidly grows above the age of 50 [1]. In humans, ACF appear with similar frequency in both sexes, even in persons with higher risk of CRC occurrence. The colonocytes that constitute the ACF produce mucus in the same way as the normal colonic cells, however such mucus is qualitatively different. This condition leads to an increase in the sialomucin content and a reduction in sulfomucins in the goblet cells of the endothelium of glands generating the ACF [2]. At this point it is worth saying that the cells secreting the mucus in the ACF may contain a mix of both of the above mucilaginous compounds or only one of them, or they may be completely devoid of mucus. Moreover, the colonocytes in the ACF are characterised by a smaller number of microvilli as compared with regular cylindrical cells of the endothelium of the large intestine mucosa. It is worth pointing out that ACF were described for the first time by R. Bird in 1987, during his research on mice subjected to the activity of a mutagenic agent - azoxymethane [3]. In the period of 2-3 weeks after the mutagen administration, observable ACF appeared in the large intestine of the mice, which stained darker with methylene blue than the neighbouring regular crypts, and their orifices were visibly different, with thickened outer edges, as compared with the unchanged mucosa surrounding the aberrant foci.

Kinzler and Vogelstein perceive ACF as the earliest identifiable morphological changes in the cycle of molecular-morphological incidents leading to the development of colorectal cancer [4]. ACF constitute heterogeneous changes, which means, among other things, that some of them may transform into cancer while the others remain unchanged for a long period of time.

The first description of ACF in humans appeared in 1991 and concerned resected fragments of the large intestine due to carcinoma [5]. At the same time it was observed that human ACF are characterised by almost identical morphological exponents as those noted in experimental animals and distinguished by the following properties: the crypts within the ACF are much wider with a thickened area; they stain darker with methylene blue than normal crypts; their orifices differ from healthy crypts with round or oval orifices.

According to the Vogelstein theory, carcinogenesis related to colorectal cancer is a multistep and multilevel process associated with the progress from normal colonocyte through aberrant crypt foci (ACF) and adenoma with dysplasia to invasive carcinoma [6]. The process of CRC development is preceded with intermediary changes, of which, according to clinical experience, only a small part transforms into malignant form [7]. Modern medicine strives to achieve the earliest possible detection and treatment of precancerous conditions such as the ACF and certain polyps of the large intestine. ACF, i.e. aberrant crypt foci are the earliest developing precursors of endothelial cancer of the large intestine. Early lesion detection and their extraction during colonoscopy (ACF, large intestine polyps) may constitute a preventive method and serve to improve treatment results. For carcinoma detected in its symptomless period, the prognosis is significantly more favourable.

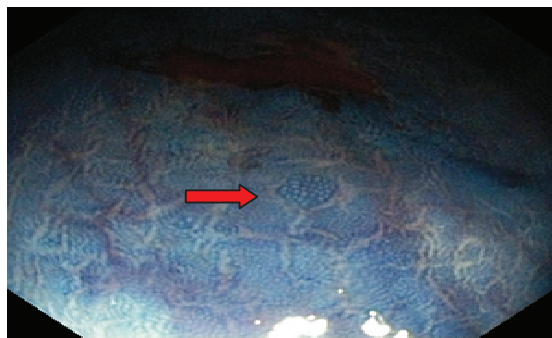
ACF ENDOSCOPIC IMAGE

ACF are not visible in standard colonoscopy but are well-identified with the use of high-magnification chromoendoscopy with methylene blue or indigo carmine staining. When stained with methylene blue, microscopic examination of biopsy samples taken from the ACF area revealed larger crypts with widened orifices surrounded with a thickened endothelium and a reduced quantity of mucus; the so-called MDF (*Mucin Depleted Foci*). The ACF may lay 'flat', be elevated or immersed in the mucosa surface. The shape of the gland lumen in the ACF is largely dependent on their histological structure [8]. Similarly to morphology, the phenotypic and genotypic properties of ACF are distinguishable from regular crypts.

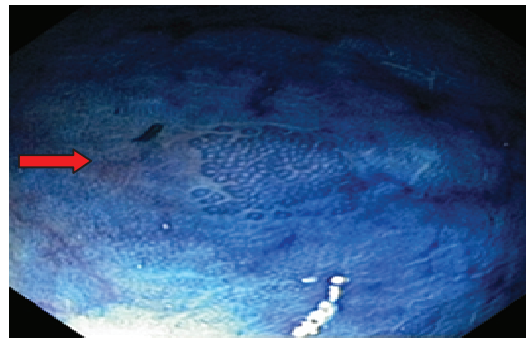
Badanie mikroskopowe oligobiopłatów pobranych z obszaru ACF, barwionego błękitem metylenowym ujawnia krypty większego kalibru, o poszerzonym ujściu, otoczone pogrubiłym nabłonkiem, ze zmniejszoną ilością śluzu; - tzw. MDF (ang. *Mucin Depleted Foci*). ACF mogą być „płaskie”, uniesione lub zagłębione wobec powierzchni błony śluzowej. Kształt światła gruczołów w ACF zależy w dużej mierze od budowy histologicznej [8]. Podobnie jak morfologia również cechy fenotypowe i genotypowe ACF są różne od krypt prawidłowych. Dane fenotypowe i genotypowe w ACF były opisane dokładnie przez Pretlow [9] i Alrawi [10] a mianownictwo histologiczne przedstawił dokładnie Di Gregorio w 1997 roku [11] oraz Fenoglio-Preiser [12]. Rozmieszczenie ACF w jelicie grubym dobrze koreluje z występowaniem zarówno polipów, jak i raka jelita grubego. ACF najczęściej lokalizują się w odbytnicy i lewej połowie okrężnicy. Średnia gęstość, czyli -ilość/ ACF w cm², jest większa w odbytnicy, niż w innych odcinkach jelita grubego [11,13,14]. Warto w tym miejscu nadmienić, że największa gęstość ACF towarzyszy RJG, zespołom polipowatości oraz dziedzicznemu rakowi jelita grubego bez polipowatości (HNPCC).

OBRAZ HISTOPATOLOGICZNY

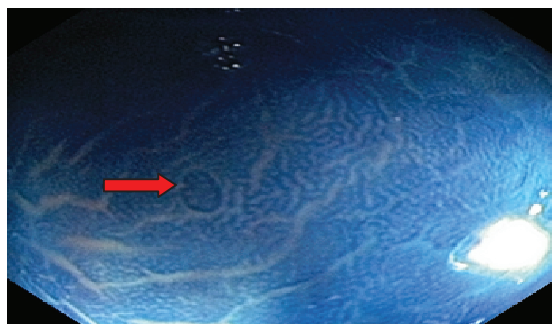
Mikroskopowo ACF widoczne są jako gniazda zbudowane z kilku do około 200 nieprawidłowych cew gruczołowych. Obecnie, ze względu na budowę histopatologiczną wyróżnia się cztery podstawowe formy ACF: niedysplastyczne (typowe i hiperplastyczne), dysplastyczne i mieszane [15]. W publikacjach znajdujemy również określenie „ACF w I stopniu nieprawidłowości”, które są traktowane jako bezpośrednie prekursorzy gruczolaków [16,17].



Rys. 1. ACF normalny (typical ACF).
Materiał własny autora.



Rys. 2. ACF hiperplastyczny (hyperplastic ACF).
Materiał własny autora.



Rys. 3. ACF dysplastyczny (dysplastic ACF).
Materiał własny autora.



Rys. 4. ACF mieszany (mixed ACF).
Materiał własny autora.

Typowy ACF (określane również jako „normalny”) Ryc. 1- różni się od prawidłowej histoarchitektoniki błony śluzowej jelita grubego poszerzeniem światła krypt o około 1,5-2,5x. Komórki nabłonka jelitowego posiadają regularnie ułożone jądra. Ogniska ubytku mucyny oraz wykładniki mikroskopowe dysplazji są nieobecne. Jądra komórek kubkowych są ułożone przypodstawnie.

The phenotypic and genotypic data of the ACF have been described in detail by Pretlow [9] and Alrawi [10], whereas the histological nomenclature was presented by Di Gregorio in 1997 [11] and Fenoglio-Preiser [12]. The distribution of ACF in the large intestine correlates well with the occurrence of polyps as well as CRC. The most common location of ACF is the rectum and the left part of the colon. Average density, i.e. the ACF quantity per cm² is higher in the rectum than in other segments of the large intestine [11, 13, 14]. It is worth mentioning that the highest ACF density accompanies CRC, polyposis syndromes, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC).

HISTOPATHOLOGICAL IMAGE

Under the microscope ACF are seen as clusters of several to 200 irregular glandular ducts. Currently, due to their histopathological structures, it is possible to distinguish four basic ACF forms: non-dysplastic (typical and hyperplastic), dysplastic and mixed [15]. In various publications we may also find the term of 'stage I abnormality ACF' treated as immediate adenoma precursors [16, 17].

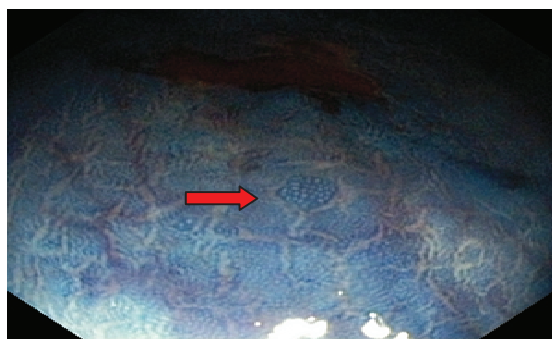


Fig. 1. Typical ACF (author's own material).

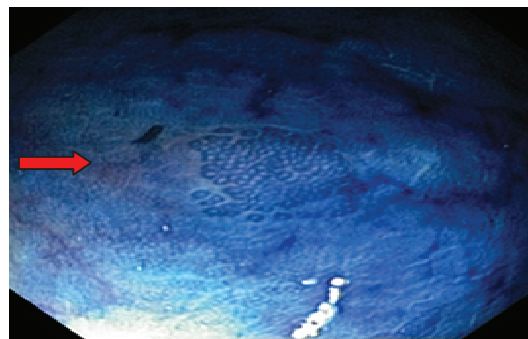


Fig. 2. Hyperplastic ACF (author's own material).



Fig. 3. Dysplastic ACF (author's own material).



Fig. 4. Mixed ACF (author's own material).

Typical ACF (also defined as '*normal*') – Fig. 1 – differ from regular histoarchitecture of the mucosa of the large intestine by crypt lumen extended by approx. 1.5-2.5x. The endothelial cells of the intestine are characterised by regularly arranged nuclei. Mucin-deficient foci and microscopic exponents of dysplasia are not present. Goblet cell nuclei have a basal location. On average, there are up to 30 glands/crypts in the ACF concentration of this type. The mitotic activity of intestinal absorptive cells is located in the lower 1/3 of the glandular tract. Normal ACF develop in the intermucosal area. This is the most common ACF type, even in patients with evident colorectal cancer. They are usually detected in the rectum and sigmoid colon [12].

Średnio występuje do 30 gruczołów/krypt w tego typu ognisku ACF. Aktywność mitotyczna komórek nabłonka jelitowego jest zlokalizowana w 1/3 dolnej strefy cewy gruczołowej. ACF normalne rozwijają się śródśluzówkowo. Jest to najczęściej występujący rodzaj ACF, nawet u pacjentów z ewidentnym rakiem jelita grubego. Ten typ ACF jest najczęściej wykrywany w odbytnicy i esicy [12].

ACF hiperplastyczne Ryc. 2 - posiadają fenotyp podobny do polipów hiperplastycznych. W tych ACF występują ząbkowate ujścia gruczołów a komórki kubkowe nadmiernie przepełnione śluzem, zlokalizowane są w górnych strefach gruczołów, natomiast strefa proliferacyjna nabłonka jelitowego poszerza się, obejmując 2/3 dolne krypt jelitowych. Wydłużone krypty mogą kończyć się podwójnie lub potrójnie rozgałęzionymi gruczołami. Niekiedy w nabłonku jelitowym u podstawy krypt pojawiają się komórki Panetha. Komórki nabłonka jelitowego zawierają nieznacznie powiększone jądra z pęcherzykowymi wpukleniami cytoplazmy, bez rzekomego nawarstwienia się jąder. MDF są sporadycznie spotykane. Grudki chłonne okołogniskowe są obecne w około 40% hiperplastycznych ACF. Liczba gruczołów jelitowych w ognisku ACF może dochodzić do 150. Ciałka apoptotyczne w komórkach nabłonka jelitowego występują sporadycznie [14]. ACF hiperplastyczne są częściej stwierdzane w odbytnicy i lewej połowie okrężnicy. Często są uniesione ponad poziom otaczającej te ogniska, prawidłowej błony śluzowej jelita grubego [12].

ACF dysplastyczne Ryc. 3 zawierają komórki z powiększonymi, pęcherzykowatymi i nawarstwionymi jądrami, które utraciły prawidłową polaryzację. Często zawierają one wydatte jąderka i są różnokształtne. Stopień nasilenia w/w zmian morfologicznych zależy od stopnia dysplazji. Aktywność mitotyczna nabłonka jelitowego jest zlokalizowana w 1/3 górnej krypty [11,14]. Ponadto w tych komórkach stosunek cytoplazmy do jądra przesuwają się na korzyść tego drugiego. W nabłonku jelitowym komórki kubkowe występują sporadycznie, przy czym pojawiają się liczne są ogniska MDF.

Mucyna występuje w postaci wodniczek lub też pojawia się w świetle krypt, pozakomórkowo, często nieregularnie rozmieszczona. Występują także liczne ciała apoptotyczne, zdecydowanie częściej niż w innych postaciach ACF. Współwystępowanie grudek chłonnych i skupisk limfocytów jest 3-8 razy częstsze niż w otaczającej śluzówce a także w innych postaciach ACF [14]. Ujścia gruczołów mają kształt szczelinowaty lub zbliżony do elipsy.

Tego typu ACF są częściej stwierdzane w kątnicy i wstępnicy. Warto przy tym zaznaczyć, że występują u prawie wszystkich pacjentów z FAP (ang. Familial Adenomatous Polyposis). Także częściej występują one u pacjentów z gruczolakami i rakiem jelita grubego. Omawiając ACF dysplastyczne należy wspomnieć o ACF w I^o nieprawidłowości (ACF stage I abnormality), które opisali dokładnie w swojej pracy Otori i wsp. [16]. Po raz pierwszy o takich kryptach wspominał Deschner w 1983 roku, opisując krypty, w których strefa proliferacyjna obejmowała warstwy powierzchniowe nabłonka jelitowego. Powiększone jądra, często nawarstwione, redukcja komórek kubkowych i rozgałęzione wieloramiennie krypty są charakterystyczne dla tego rodzaju ACF [17]. Często u tych samych pacjentów występują one obok ACF hiperplastycznych i mikrogruczolaków. Ogniska ACF w I^o nieprawidłowości są dużymi ogniskami zawierającymi średnio około 100 krypt. Indeks mitotyczny jest wyższy niż w ACF hiperplastycznych a mniejszy niż w mikrogruczolakach. Otori i wsp. udowadniają w swojej pracy, że ACF w I^o nieprawidłowości są formą przejściową między ACF hiperplastycznym i mikrogruczolakiem, co może być również patogenetycznym ogniwem łączącym ACF hiperplastyczny- gruczolak ząbkowany i rak gruczołowy jelita grubego [16].

ACF mieszane Ryc. 4 - zawierają cechy normalnych, hiperplastycznych i dysplastycznych ACF w obrębie jednego ogniska. Nascimbeni i wsp. w swojej pracy wykazali, że ACF mieszane są najczęściej dużymi ogniskami, a współistnienie w jednym ognisku dwóch rodzajów krypt, może sugerować przemianę hiperplastycznych ACF do dysplastycznych [8]. Występowanie w jednym ognisku ACF typowych i hiperplastycznych, może sugerować przekształcenie tych pierwszych w hiperplastyczne.

Hyperplastic ACF – Fig. 2 – with phenotype similar to hyperplastic polyps. The above ACF are characterised by fissured gland orifices, while goblet cells with excess mucus are localized in the upper gland areas, the proliferation area of the intestinal endothelium expands taking over 2/3 of the lower intestinal crypts. Elongated crypts may end with glands with two or three branches. At times, Paneth cells appear at crypt bases in the intestinal endothelium. Intestinal endothelium cells contain insignificantly enlarged foci with vesicular cytoplasmic protrusions without spurious foci accumulation. MDF occurrence is sporadic. Perifocal lymphoid nodules are present in nearly 40% of hyperplastic ACF. The number of intestinal glands in an ACF agglomeration may reach up to 150. Apoptotic bodies in the cells of intestinal endothelium occur sporadically [14]. The most common location of hyperplastic ACF is the rectum and the left part of the colon. Often, they are elevated above the surrounding regular mucosa of the large intestine [12].

Dysplastic ACF – Fig. 3 – contain cells with enlarged vesicular and aggregated foci that lost their regular polarization. They are frequently characterised by prominent nuclei of different shapes. The intensification of the above morphological lesions depends on dysplasia advancement. The mitotic activity of intestinal absorptive cells is located in the 1/3 portion of the upper crypt [11, 14]. Moreover, the ratio between the cytoplasm and the nucleus in such cells is shifted towards the latter one. Goblet cells in the intestinal endothelium are sporadic, whereas MDF agglomerations tend to be numerous. Mucin occurs in the form of vacuoles or appears in the crypt lumen, extracellularly, often in an irregular arrangement. The occurrence of numerous apoptotic bodies is also observed, to a much greater extent as compared with other ACF forms. Co-occurrence of lymphoid nodules and lymphocyte aggregations is 3-8 times more common than in the surrounding mucosa or other ACF forms [14]. Gland orifices are characterised by an elliptical shape. The ACF of this type are more commonly detected in caecum and the ascending colon. It is worth emphasising that they are present in nearly all FAP patients (Familial Adenomatous Polyposis). They are also more common in patients with adenomas and colorectal cancer. When discussing dysplastic ACF it is necessary to mention stage I abnormality ACF described in detail by Otori and others [16]. Such crypts were described for the first time by Deschner in 1983 while he provided the characterisation of crypts with proliferation area encompassing the superficial layers of intestinal endothelium. Accumulation of enlarged foci, reduced goblet cells and crypts with multiple branches are the characteristic properties of this ACF type [17]. Frequently they occur in the same patients next to hyperplastic ACF and microadenoma. Stage I abnormality ACF agglomerations are large and contain on average ca.100 crypts. The mitotic index is higher as compared with hyperplastic ACF, however lower than the one estimated for microadenomas. Otori and others prove in their work that stage I abnormality ACF constitute a transitional form between hyperplastic ACF and a microadenoma, which may also be a pathogenetic link between hyperplastic ACF, serrated adenoma and colorectal cancer [16].

Mixed ACF – Fig. 4 – with the features of normal, hyperplastic and dysplastic ACF within a single agglomeration. Nascimbeni and others revealed in their work that mixed ACF commonly constitute large agglomerations, whereas concomitance of two crypt types within a single agglomeration may suggest hyperplastic ACF transformation towards the dysplastic form [8]. The presence of typical and hyperplastic ACF within a single agglomeration may, on the other hand, suggest transformation of the former into hyperplastic forms.

MOLECULAR CONDITIONS

The majority of ACF occurring in FAP is histologically, genotypically and phenotypically different from sporadic ACF. The agglomerations of abnormal crypts appearing in FAP generally consist of dysplastic forms [18]. In FAP-related ACF, APC mutation is more frequent (100%) than k-ras mutation (sporadic).

UWARUNKOWANIA MOLEKULARNE

Większość ACF występujących w FAP jest histologicznie, genotypowo i fenotypowo różna od sporadycznych ACF. Ogniska nieprawidłowych krypt występujące w FAP są w większości dysplastyczne [18]. W ACF związanych z FAP występuje częściej APC mutacja (100%) niż k-ras mutacja (sporadycznie). Zaburzenia metylacji pojawiają się sporadycznie przy czym stwierdza się wzrost cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji beta-cateniny. W swoim badaniu Nucci i wsp. stwierdzili obecność antygeny grupowego krwi Lewis-a i Lewis-b oraz wzrost ich ekspresji w różnych rodzajach ACF [13]. Pewien odsetek komórek tworzących ACF wykazuje monoklonalność, co oznacza, że pochodzą one od jednej „złędzonej” komórki. Tego typu sytuacja częściej była stwierdzana w ACF z dysplazją i w komórkach atypowych [19/19]. Może to być wskazówką, że komórki wykazujące monoklonalność mają silny związek z progresją nowotworową. Podobnie jak w raku jelita grubego i gruczolakach w ACF stwierdza się z różną częstością niestabilność mikrosatelitarną, oraz mutację genów -ras i APC. W ACF K-ras mutacja występuje z częstością 69-100%. Pojawia się ona częściej w ACF klasyfikowanych jako typowe i hiperplastyczne, natomiast rzadziej w ACF dysplastycznych [1,20,21,22]. Stwierdzono, że większe ogniska ACF mają mniejszy odsetek K-ras mutacji niż mniejsze (ok. 60%). Warto przy tym nadmienić, że K-ras mutacja występuje częściej w ACF sporadycznych niż ACF związanych z FAP. Większa częstość K-ras mutacji występująca w ACF hiperplastycznych i hiperplastycznych polipach między innymi sugeruje, że te pierwsze mogą być prekursorami tych drugich.

W przeciwieństwie do mutacji genów -ras, mutacja genu APC występuje rzadko w ACF, stwierdza się ją zaledwie w kilku procentach przypadków sporadycznych ACF [23]. Częściej występuje w ACF dysplastycznych niż niedysplastycznych [22]. Hipermetylacja wysepek CpG jest również stwierdzana w ACF. Może ona występować w jednym lub wielu loci genowych. Stwierdza się ją częściej w ACF u ludzi z rakiem jelita grubego (kilkadziesiąt procent), a rzadziej w przypadku FAP i gruczolaków (kilkanaście procent) [23,24].

Zaburzenia metylacji wysp CpG w ACF dotyczą najczęściej genów supresorowych i genów mutatorowych takich jak p53, p16, hMLH1, hMSH2. Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) w ACF występuje z częstością kilkanaście do 30%, podobnie jak w sporadycznych rakach jelita grubego. Jej częstość wzrasta u ludzi z większym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego oraz w przypadkach HNPCC, gdzie jej częstość może dochodzić do 95% [25]. Najczęściej niestabilność mikrosatelitarna dotyczy genów mutatorowych. W swoim badaniu Greenspan i wsp. pokazali, że częściej MSI występuje w ACF hiperplastycznych i rakach jelita grubego, które powstają na patogenetycznym szlaku od ACF hiperplastycznego przez gruczolaka ząbkowanego na gruczolakoraku kończąc [26]. Podobnie jak gruczolaki jelita grubego zachowują się ACF po długotrwałym przyjmowaniu preparatów kwasu acetylosalicylowego i Sulindaku. Jak podaje Takayama i wsp. [1]. oraz Shpitz i wsp. [27]. widoczne jest zmniejszenie liczby ACF oraz zanik stwierdzanych ACF u osób przyjmujących te preparaty dłużej niż rok. W badaniach genetycznych wykrywano mutację genu p53 w pojedynczych przypadkach ACF [20]. Występowanie mutacji genu p53 w niewielkim odsetku ACF, może między innymi świadczyć o tym, że są one wczesnymi stadiami w karcinogenezie RJG, w którym mutacja p53 występuje z większą częstością Vogelstein i wsp. podają, że mutacja ta występuje w późnych etapach karcinogenezy w RJG [6]. Utrata heterozygotyczności (LOH) w ACF najczęściej była spotykana w obrębie genu (11p11) kodującego białkowy receptor typu J fosfatazy tyrozyny (PTPRJ) i to jedynie wśród ACF badanych u ludzi z rakiem jelita grubego [28/28]. Podobnie jak w raku jelita grubego, tak i w ACF identyfikuje się antygen karcinoembrionalny (CEA) występujący z częstością nawet do 90% [15]. W procesie karcinogenezy RJG zmniejsza się wyraźnie ekspresja błonowa beta-cateniny a zwiększa w cytoplazmie i jądrze komórkowym. W ACF poza obecnością beta-cateniny stwierdza się również inne molekuly adhezyjne jak: P-cadherinę i E-cadherinę. Jak wykazał Cheng i wsp. poziom jądrowej beta-cateniny wyraźnie wzrasta od ACF przez gruczolaki do raka jelita grubego i sugeruje, że ACF i zmiany komórkowej ekspresji beta-cateniny w kolonocytach odgrywają istotną rolę w jelitowej kancerogenezie [15].

Methylation disorders occur sporadically, yet the cytoplasmatic and nuclear beta-catenin expression increase is observable. In their research, Nucci and others, confirmed the presence of the blood group antigen Lewis-a and Lewis-b as well as an increase in their expression in various ACF types [13]. A certain proportion of cells making up the ACF indicate monoclonality, which means that they originate from a single "stray" cell. Such a situation was more commonly observed in dysplastic ACF and atypical cells [19/19]. This may be an indication that cells with the traits of monoclonality are deeply related to cancer progression. Similarly to colorectal cancer and adenomas, the ACF display various levels of microsatellite instability and -ras and APC gene mutation. K-ras mutation in the ACF occurs with the frequency of 69-100%. It is more common in the ACF classified as typical and hyperplastic, and rare in dysplastic ACF [1, 20, 21, 22]. It was noted that larger ACF agglomerations are characterised by a smaller ratio of K-ras mutations as compared with the smaller ones (ca. 60%). It is also worth mentioning that K-ras mutation is more frequent in sporadic ACF than in FAP-related ACF. A higher K-ras mutation frequency occurring in hyperplastic ACF and hyperplastic polyps suggests, among other things, that the former may be precursors of the latter. As opposed to -ras gene mutation, the mutation of the APC gene in ACF is rare, as it is observed only in several per cent of the cases of sporadic ACF [23]. It is more frequent in dysplastic ACF than non-dysplastic ones [22]. Hypermethylation of CpG islands is also observable in ACF. It may occur in one or two gene loci. It is more common in the ACF of patients with colorectal cancer (a few dozen per cent), and less frequent in the case of FAP and adenoma (below twenty per cent) [23, 24]. CpG island methylation disorders in ACF mainly concern suppressor and mutator genes, such as p53, p16, hMLH1 and hMSH2.

Microsatellite instability (MSI) in ACF appears at the rate of less than twenty to 30%, similarly to sporadic colorectal cancers. Its incidence is higher in people with an elevated risk of colorectal cancer, as well as in the cases of HNPCC, where it may reach as much as 95% [25]. Usually, microsatellite instability concerns mutator genes. Greenspan and co-authors showed in their study that the most common MSI occurrence is observed in hyperplastic ACF and colorectal carcinoma resulting from the pathogenetic process starting from hyperplastic ACF, through serrated adenoma to invasive carcinoma [26]. The ACF after long-term administration of acetylsalicylic acid and Sulindak behaved similarly to colon adenoma. According to Takayama and others [1] and Shpitz and others [27] a significant reduction in ACF number as well as ACF disappearance was noted in patients taking the above medicines for a period exceeding a year.

The conducted genetic tests revealed gene p53 mutation in individual ACF cases [20]. The occurrence of gene p53 mutation in a small ACF proportion may mean, among other things, that they constitute an early stage in the CRC carcinogenesis, where p53 mutation is more frequent. In the study by Vogelstein and co-authors we read that this particular mutation occurs in late CRC carcinogenesis stages [6]. Loss of heterozygosity (LOH) in ACF was most commonly encountered within the gene (11p11) coding the protein receptor-type protein-tyrosine phosphatase J (PTPRJ) only among the ACF examined in patients with colorectal carcinoma [28/28]. As it is the case with the colorectal cancer, also in ACF we identify carcino-embryonic antigen (CEA) with the occurrence rate reaching even 90% [15]. In the CRC carcinogenesis process beta-catenin expression in the membrane is visibly reduced; however, it increases in the cytoplasm and the cell nucleus. Besides the presence of beta-catenin in ACF we may also detect other adhesive molecules, such as: P-cadherin and E-cadherin.

According to Cheng and others, the nuclear beta-catenin level is characterised by a significant increase in the process from ACF through adenoma to colorectal cancer, which implies that ACF concomitant with changes in the cellular beta-catenin expression in colonocytes play an important role in intestinal carcinogenesis [15]. Normal and hyperplastic ACF are characterised by correct membranous location of beta-catenin, as it is the case with normal colonocytes.

W ACF normalnych i hiperplastycznych stwierdza się prawidłową-błonową lokalizację beta-cateniny, podobnie jak w prawidłowych kolonocytach. W ACF dysplastycznych widoczna jest redukcja błonowej ekspresji beta-cateniny a wyraźny wzrost cytoplazmatycznej i jądrowej (54%). ACF są stosunkowo łatwo wykrywalnymi zmianami. Cechuje je znaczna różnorodność histologiczna, genotypowa i fenotypowa. Mogą być prekursorami gruczolakoraków jelita grubego w dwóch ścieżkach: zależnej od APC mutacji (przez dysplastyczny ACF i gruczolaka) oraz zależnej od K-ras mutacji, MSI i hipermetylacji DNA (przez hiperplastyczny ACF i gruczolak ząbkowany). Jak wykazują liczne badania ACF mają epidemiologiczne, biochemiczne, genetyczne i morfologiczne cechy podobne do gruczolakoraków jelita grubego. Zatem mogą być traktowane jako pierwsze, identyfikowalne prekursory raka jelita grubego.

Dysplastic ACF reveal a visible reduction in the membranous beta-catenin expression as well as a distinct increase in cytoplasmatic and nuclear expression (54%). ACF are regarded as relatively easily detectable lesions. They are characterised by considerable histological, genotypic and phenotypic diversity. They are presumable precursors of invasive carcinoma of the large intestine by following either of the two pathways: APC-dependent mutation (through dysplastic ACF and adenoma) and K-ras-dependent mutation, MSI and DNA hypermethylation (through hyperplastic ACF and serrated adenoma). According to numerous studies, ACF are characterised by epidemiological, biochemical, genetic and morphological traits similar to the invasive carcinoma of the large intestine. Thus, they may be perceived as the first identifiable precursors of colorectal cancer.

BIBLIOGRAPHY

1. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y i wsp. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer *N Engl J Med* 1998; 339: 1277-84;
2. Sandforth F, Heimpel S, Balzer T i wsp. Characterization of stereomicroscopically identified preneoplastic lesions during dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1988; 18(6): 655-62;
3. Bird RP Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987; 37(2): 147-51;
4. Kinzler KW, Vogelstein B Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87(2): 159-70;
5. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS i wsp. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 1991; 51: 1564-67;
6. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S i wsp. Genetic alteration during colorectal- tumor development *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532;
7. Muto T, Bussey HJR, Morson BCM The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36(6): 2251-70;
8. Nascimbeni R, Villanacci V, Mariani PP i wsp. Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1256-63;
9. Pretlow P, Pretlow TG Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 83-96;
10. Alrawi SJ, Schiff M, Carrol RE i wsp. Aberrant crypt foci. *Anticancer Res* 2006; 26: 107-119;
11. Di Gregorio C, Losi L, Fante R i wsp. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* 1997 ; 30(4): 328-34 ;
12. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A Review article: Aberrant crypt foci: A Review. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 632-642;
13. Nucci MR, Robinson CR, Longo P Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol* 1997; 28: 1396-1407;
14. Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y i wsp. Aberrant crypt foci in human colons: Distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol* 1998; 29: 469-475;
15. Cheng L, Lai MD Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2642-9;
16. Otori K, Sugiyama K, Hasebe T i wsp. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer res* 1995; 55: 4743-6;
17. Deschner EE Adenomas: preneoplastic events, growth and development in man and experimental system. *Pathol Annual* 1983; 18(1): 205-219;
18. Roncucci L, Stamp D, Medline AA i wsp. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991; 22: 287-94;

19. I-Mei Siu, Robinson DR, Schwarz S i wsp. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res* 1999; 59: 63-66;
20. Losi L, Roncucci L, Di Gregorio C i wsp. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996; 178: 259-263;
21. Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B i wsp. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* 1997; 115: 39-46;
22. Smith AJ, Stern HS, Penner M i wsp. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994; 54: 5527-5530;
23. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N i wsp. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994; 54: 5523-5526;
24. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS i wsp. CpG Island Methylation in Aberrant Crypt Foci of the Colorectum. *Am J Pathol* 2002; 160: 1823-1830;
25. Rashid A, Shen L, Morris JS i wsp. CpG island methylation in colorectal Adenomas. *Am J Pathol* 2001; 159: 1129-1135;
26. Greenspan EJ, Cyr JL, Pleau DC i wsp. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from patients without concurrent colon cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28(4): 769-776;
27. Shpitz B, Klein E, Neufeld D i wsp. Suppressive effect of aspirin on aberrant crypt foci in patient with colorectal cancer. *Gut* 2003; 52(11): 1598-1601;
28. Luo L, Shen G.Q, Stiffler K i wsp. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27(6): 1153-1159.

dr med. Marek Kowalczyk
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
w Olsztynie
Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej
i Małoinwazyjnej
Olsztyn ul. Warszawska 30
forel@neostrada.pl

dr med. Wiesław Pesta
Oddział Chirurgii Ogólnej
i Małoinwazyjnej z Ośrodkiem
Chirurgicznego Leczenia Otyłości
Szpital ZOZ, 21-010 Łęczna
ul. Krasnystawska 52
wieslaw.pesta@vp.pl

dr hab. med. Krzysztof Zinkiewicz
II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Gastroenterologicznej i Nowotworów
Układu Pokarmowego
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
SPSK 1 ul. Staszica 16 20-081 Lublin
kzinek@yahoo.com

dr hab. med. Agnieszka Pedrycz
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
z Pracownią Cytologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin
e-mail: apw4@wp.pl

prof. dr hab. n. med. Krzysztof Paśnik
Klinika Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej,
Metabolicznej i Torakochirurgii CSK
MON WIM (lub Military Hospital)
Warszawa ul Szaserów 128
kpasnik@gmail.com

dr med. Piotr Siermontowski
Zakład Medycyny Morskiej
i Hiperbarycznej
Wojskowy Instytut Medyczny
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3
skr. poczt. 18
e-mail: nurdok@tlen.pl

dr n. med. Marcin Orłowski
Przychodnia Lekarska Nowy Chęlm
Sp z o.o
Centrum Diagnostyki i Terapii Chorób
Przewodu Pokarmowego
ul. Chałubińskiego 23 80-807, Gdańsk
tel/fax: 48 58 3036210
m.orlowski@przychodniachelm.pl

dr med. Waldemar Kurpiewski
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
w Olsztynie
Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej
i Małoinwazyjnej
Olsztyn ul. Warszawska 30

dr med. Wit Juśkiewicz
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
w Olsztynie
Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej
i Małoinwazyjnej
Olsztyn ul. Warszawska 30

mgr Iwona Kowalczyk
Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Olsztynie
Dział Diagnostyki Laboratoryjnej z Bankiem Krwi

Zgodnie z teorią Vogelsteina karcinogeneza w raku jelita grubego (RJG) jest wieloetapowym i wielopoziomowym procesem zaburzenia regulacji dojrzewania nabłonka błony śluzowej jelita, począwszy od prawidłowej komórki macierzystej tego nabłonka, przez ogniskanie prawidłowych krypt jelitowych (ACF), następnie stadium gruczolaka/dysplazji, na gruczolakoraku kończąc. ACF są niewidoczne w rutynowej kolonoskopii, natomiast dobrze identyfikowalne w kolonoskopii o wysokiej rozdzielczości, połączonej z barwieniem błony śluzowej jelita grubego, przy użyciu błękitu metylenowego lub indygokarminu.

W porównaniu z obrazem endoskopowym prawidłowych krypt, w ACF ujście krypt jest 2-3x większe, szczelinowatego i/lub gwiazdkowatego kształtu, przy czym te krypty są otoczone pogrubiałym nabłonkiem a na obszarze ACF błona śluzowa jelita grubego intensywniej chłonie (ciemniejsze wybarwienie się) znacznikowy barwnik. W badaniu mikroskopowym ACF stwierdza się gniazda składające się z od kilku do 200 gruczołów jelitowych, objętych różnego typu zmianami (rozrostowymi i/lub dysplastycznymi) dotyczącymi zarówno cyto-, jak i histoarchitektoniki.

Rozmieszczenie ACF w jelicie grubym dobrze koreluje z obszarem predylekcyjnym dla występowania zarówno polipów, jak i dla raka jelita grubego. Uwarunkowania epidemiologiczne, genetyczne i enzymatyczne w ACF są podobne do występujących w gruczolakach i RJG, wobec czego obecność ACF może być dobrym wskaźnikiem ryzyka wystąpienia RJG. ACF mogą być prekursorami gruczolaków i RJG powstających na dwóch szlakach patogenetycznych karcinogenezy: klasycznym szlaku związanym z mutacją genów APC i K-ras oraz z rzadszym szlakiem patogenetycznym, spowodowanym niestabilnością mikrosatelitarną (MSI), połączoną z hipermetylacją DNA. ACF są powszechnie uważane za pierwsze identyfikowalne morfologicznie (endoskopowo i mikroskopowo) prekursor raka jelita grubego.

ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ОЧАГОВ АБЕРРАНТНЫХ КРИПТ (АСФ)

В соответствии с теорией Vogelstein, канцерогенеза при раке прямой кишки (CRC) является многоступенчатым и многоуровневым процессом нарушения созревания эпителия слизистой оболочки кишечника, начиная от нормальных эпителиальных стволовых клеток, через очаг неправильных кишечных крипт (ACF), затем стадия аденомы / дисплазия и на окончание аденокарцинома. ACF невидимые в рутинной колоноскопии, тогда как хорошо идентифицируются в колоноскопии высокого разрешения в сочетании с окрашиванием слизистой оболочки толстой кишки, используя метиленовую синь или индигокармин. По сравнению с эндоскопическим изображением нормальных крипт, в ACF устье крипт 2-3 раза больше в форме щели или звезды, при чем эти крипты окружены утолщенным эпителием, а в области ACF слизистая оболочка толстой кишки интенсивно поглощает (темнейшие окраски) маркер краситель. Микроскопическое исследование ACF показывает, что гнездо состоит из нескольких до 200 кишечных желез, обнятых изменениями различными типов (гиперпластических и / или диспластические), касающиеся как цито- так и гисто-архитектоники.

Расположение ACF в толстой кишке хорошо коррелирует с областью склонной к возникновению как полипов, так и колоректального рака. Условия эпидемиологических, генетических и ферментативных ACF аналогичны тем, которые найдены в аденоме и CRC, так что присутствие ACF может быть хорошим индикатором риска CRC. ACF может быть предшественником аденомы и CRC, возникающим на двух путях патогенной канцерогенезу: классическим пути, связанным с мутацией гена APC и KRas и с более редким патогенным путем, вызванным микросателлитной нестабильностью (MSI) в сочетании с гиперметилированием ДНК. ACF, по праву принято считать первым морфологически идентифицируемые (эндоскопически и микроскопически) прекурсоры рака толстой кишки.

Ключевые слова: колоректальный рак, хромоэндоскопия, ACF.