



Univerzita Karlova v Praze

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce

Expresse NO syntáz, TGF-beta 1 a EGF u
nemocných s prokázanou orofaryngeální infekcí
Helicobacter pylori a jeho úloha u patologií
orofaryngu

MUDr. Petr Lukeš

Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie.

Předseda oborové rady:
Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF
UK a FN v Motole

Autor: MUDr. Petr Lukeš

Školitel: Doc. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

SOUHRN

Práce se zabývá studiem přítomnosti *Helicobacter pylori* (HP) v lymfatické tkáni orofaryngu a změnami exprese vybraných cytokinů v souvislosti s imunitní odpovědí vyvolanou touto bakterií. V minulosti byla zkoumána oblast dutiny ústní jako možný rezervoár infekce HP. Informace o možné kolonizaci orofaryngu jsou dosud neúplné. Patogenetické působení HP v lymfatické tkáni orofaryngu nebylo dosud zkoumáno. Předpokládá se, že by HP mohl být zapojen do patogeneze chronického zánětu, ale i karcinogeneze této oblasti.

V této práci byla zkoumána přítomnost HP v lymfatické tkáni orofaryngu u pacientů s tonsilárním karcinomem, chronickou tonsilitidou a syndromem obstrukční spánkové apnoe (OSAS) pomocí real-time PCR. U části pacientů byl následně vyšetřen i žaludek na přítomnost HP pomocí ureázového dechového testu a PCR. V séru pacientů byly zjišťovány protilátky proti HP a dále hladiny cytokinů (EGF a TGF-beta1), které jsou známy svými účinky při karcinogenezi epitelu. Rozdíly v expresi iNOS, eNOS a kaspázy 3 byly detekovány ve tkáni.

Výsledky ukázaly, že lymfatická tkáň orofaryngu je osídlena HP u vysokého procenta osob, bez statisticky významných rozdílů v osídlení u různých diagnóz. Genotypová analýza orofaryngeálních kmenů ukázala, že převažovaly méně virulentní kmeny HP. Detekce žaludečního infekce ukázala, že HP může být přítomen v orofaryngu nezávisle na žaludku. Porovnání orofaryngeálních a žaludečních genotypů ukázalo, že jedinec může hostit rozdílné kmeny HP v obou lokalizacích.

Cytokinová analýza neukázala statisticky významné rozdíly v sérových hladinách EGF a TGF-beta 1 u různých diagnóz. Lze z toho usuzovat, že infekce HP nevyvolává systémovou cytokinovou odpověď. Ve tkáni byly popsány morfologické rozdíly v expresi iNOS, eNOS a kaspázy-3 u různých diagnóz.

Výsledky dosažené v této práci potvrdily významnou extragastrickou lokalizaci infekce HP. Přímé zapojení HP v orofaryngeální karcinogenezi se zdá být nepravděpodobné. Vliv HP na změny sérových hladin EGF a TGF-beta 1 nebyl prokázán. Nelze však vyloučit vliv HP na rozvoj chronického zánětu a hypertrofie lymfatické tkáně orofaryngu lokálním ovlivněním imunitní odpovědi hostitele.

SUMMARY

The thesis focuses on detection of *Helicobacter pylori* (HP) in the oropharyngeal lymphatic tissue and changes of selected cytokines expression according to the inflammatory response to the HP infection. Oral cavity was investigated for HP presence recently. Data about possible colonisation of oropharyngeal tissue are insufficient. The pathogenetic effect of HP in the oropharyngeal tissue was not investigated yet. It is supposed, that HP could lead to inflammation or carcinogenesis of oropharyngeal tissue analogous to gastric mucosa.

The presence of HP in oropharyngeal tissue samples of patients suffering from tonsillar carcinoma, chronic tonsillitis or obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) was investigated in this study. Real-time PCR was used. Part of the patients was investigated for gastric HP presence using Urea Breath Test (UBT) and PCR. Specific anti-HP antibodies and levels of EGF and TGF-beta 1 were detected in sera. Differences in iNOS, eNOS and caspase-3 were detected in tissue samples using immunohistochemistry.

The results confirmed the HP colonisation of lymphatic tissue in high numbers of patients. No significant differences were found when comparing different oropharyngeal pathologies. The frequent presence of low-toxic HP genotypes was shown by gene analysis. Detection of gastric HP showed that oropharyngeal HP presence could be independent to gastric infection. Oropharyngeal and gastric HP strains comparison showed that different strains can be harboured by both localisations in an individual.

No significant differences in EGF and TGF-beta 1 serum levels were found. This can be concluded that HP infection does not elicit the systemic cytokine response of the host immune system. Morphologic differences in iNOS, eNOS and caspase 3 expression were found in different oropharyngeal pathologies.

The results brought new information about human HP infection. Important extragastric site of HP infection was confirmed. The results show that direct connection of HP and oropharyngeal carcinogenesis is unlikely. HP does not influence the serum levels of EGF and TGF-beta 1. The possibility that local affection of immune system response could lead to chronic inflammation or hypertrophy oropharyngeal lymphatic tissue can not be disconfirmed.

OBSAH

1. Úvod.....	5
2. Cíle práce.....	7
3. Materiál a metodika.....	8
4. Výsledky.....	9
5. Diskuse.....	12
6. Závěry.....	19
7. Použitá literatura.....	20
8. Příloha.....	23

1. ÚVOD

Cytokiny jsou somatickými buňkami tvořené informační a regulační molekuly, které mohou být sekretované nebo zakotvené v cytoplazmatické membráně a které autokrinně, epikrinně nebo endokrinně ovlivňují fyziologické funkce buněk organismu, morfogenezu a homeostázu celého organismu. Po vazbě na membránové receptory, prostřednictvím signalizační kaskády ovlivňují metabolismus zásahové buňky a její genovou expresi (Šterzl, 2007). Cytokiny jsou zapojeny v mnoha procesech, jako je např. regulace imunitního systému či buněčný růst.

Helicobacter pylori (HP) je spirální mikroaerofilní gramnegativní bakterie. Infekce HP je pokládána za hlavní příčinu chronické gastritidy a hraje důležitou úlohu v patogenezi dalších gastroduodenálních onemocnění jako je vředová choroba, žaludeční lymfom a žaludeční karcinom (Israel and Peek, 2001). Infekce HP je pokládána za jednu z nejčastějších chronických bakteriálních infekcí u lidí. Výskyt infekce HP je odhadován mezi 40 – 80 % v závislosti na zeměpisné oblasti, věku, rase, etnicitě a socioekonomickém stavu země (Bures et al., 2006). Klinické projevy (např. vředová choroba) se však objeví jen u 10 - 15% z nich. Většina však zůstává celý život asymptomatická. To je pravděpodobně způsobeno různým stupněm virulence kmenů HP a dále různou imunitní odpovědí hostitele (Stromberg et al., 2003).

Působení HP v žaludeční sliznici bylo v minulosti podrobně popsáno. Detailnější informace o působení HP v orofaryngeální sliznici však chybí. Poškození sliznice vyvolané HP je způsobeno kombinací přímého vlivu bakteriálních toxinů a vlivu zánětlivé odpovědi imunitního systému hostitele. Chemické produkty HP atrahují buňky imunitního systému do lamina propria sliznice. HP vede k vyžívání a aktivaci dendritických buněk. Tato aktivita vede k zahájení NK (natural killer) a T_H1 efektorové odpovědi (Portal-Celhay and Perez-Perez, 2006). T_H1 polarizované lymfocyty produkující IFN – gama a spolu s aktivovanými NK buňkami hrají důležitou roli při rozvoji závažných patologií. Infekce HP v žaludeční sliznici je spojena s produkcí prozánětlivých i imunomodulačních cytokinů. Byly popsány změny v sekreci IL-8, IL-1-beta, IL-6, IL-12, IL-18, TNF-alfa (Stromberg et al., 2003). V souvislosti s poškozením žaludeční sliznice, zvýšenou proliferací a nádorovou transformací žaludečního epitelu byly popsány rovněž změny v expresi EGF, EGFR, TGF-beta a iNOS (Stromberg et al., 2003).

Analýza bakteriálního genomu vedla k identifikaci genů kódujících faktory virulence, jedná se o geny uskupené v tzv. ostrůvku patogenicity (PAI – pathogenicity island) (Mobley, 1996), z nichž nejvýznamnější je *cagA* gen (cytotoxin – asociovaný gen A), který kóduje vysokomolekulární a vysoce imunoreaktivní protein CagA přítomný asi u 60% kmenů HP (Van Doorn et al., 1999). Kmeny HP produkující CagA jsou ve srovnání s *cagA* negativními kmeny spojeny se zvýšeným rizikem vážných žaludečních patologií (peptických vředů, atrofické gastritidy, žaludečního karcinomu) (Portal-Celhay and Perez-Perez, 2006). CagA se dostává do cytoplazmy hostitelských buněk a stimuluje buněčnou signalizaci interakcí s mnoha hostitelskými molekulami (např. kinázami skupiny Src). Tato interakce vede ke zvýšené produkci cytokinů a regulačních molekul a může být spojena se zahájením nádorové transformace (Hatakeyama, 2006).

Některé kmeny HP vyvolávají vakuolizaci hostitelských buněk. Bylo zjištěno, že tento jev je vyvolán tzv. vakuolizačním cytotoxinem (VacA), který se dostává do hostitelské buněčné membrány a indukuje vakuolizaci cytoplazmy. Je kódován genem *vacA*, který nesou všechny kmeny HP. Pouze asi 50% kmenů však produkuje VacA protein (Portal –

Celhey, Perez – Perez, 2006). Je to dáno variabilitou v primární sekvenci *vacA* genu. Byly zaznamenány rozdíly v signální sekvenci (s1a, s1b, s1c, s2) genu a v centrálním regionu (m1, m2). Kmeny s s1 typem signální sekvence alel produkují funkční VacA toxin, naopak kmeny s s2 typem mají malou cytotoxickou aktivitu. Za velmi toxické jsou považovány kmeny s1/m1 a jsou spojovány s mnoha formami gastritidy, atrofie a intestinální metaplázie. Kmeny s1/m2 se vyznačují střední nebo malou produkcí VacA a kmeny s2/m2 VacA neprodukují. (Van Doorn et al., 1999).

Při předpokládaném orálně-orálním či fekálně-orálním přenosu lze očekávat přítomnost HP rovněž v dutině ústní a orofaryngu. Pokusy o detekci HP v těchto lokalitách však až dosud přinášely rozporuplné výsledky. První pozitivní detekce byly publikovány v zubním plaku a ve slinách (Allaker et al., 2002). Následně byl HP zkoumán rovněž v lymfatické tkáni orofaryngu a rovněž nazofaryngu

Otázka kolonizace lymfatické tkáně orofaryngu HP nebyla dosud uspokojivě zodpovězena. Zda HP v této lokalizaci může ovlivnit imunitní odpověď hostitele nebylo zatím zkoumáno. Předpokládá se, že by HP v lymfatické orofaryngeální tkáni Waldayerova okruhu mohl aktivovat imunitní systém (např. cestou aktivace dendritických buněk) a zasahovat do exprese různých cytokinů a tím podporovat vznik chronického zánětu a případně působit jako přímý karcinogen této oblasti.

2. CÍLE PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na studium možné kolonizace orofaryngeální lymfatické tkáně *Helicobacter pylori* a detekci rozdílu v sérové a tkáňové expresi vybraných cytokinů a regulačních molekul.

Cíle disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- A) průkaz přítomnosti HP v lymfatické tkáni orofaryngu u různých patologií a zjištění možného vlivu HP při orofaryngeální karcinogenezi

- B) genotypizace orofaryngeálních kmenů HP a porovnání se žaludečními genotypy
- C) stanovení hladin vybraných cytokinů v séru pacientů v závislosti na přítomnosti orofaryngeální infekce HP
- D) stanovení exprese iNOS ve tkáňových vzorcích zdravých a zánětlivě změněných tonsil a tonzilárních karcinomů

3.MATERIÁL A METODIKA

Sběr biologického materiálu

Všechny vzorky byly odebírány s příslušným informovaným souhlasem pacientům kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole, kteří byli operováni pro spinocelulární karcinom tonzily, chronickou tonzilitidu nebo syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSAS).

Celkově bylo do studie zařazeno 104 osob, z toho 41 s karcinomem tonzily, 38 s chronickou tonzilitidou a 25 s OSAS. U poslední jmenované skupiny byla předpokládána přítomnost zdravé tonzilární tkáně. Indikací k chirurgickému výkonu u těchto osob bylo provedení plastiky měkkého patra (UPPP – uvulo-palato-pharyngo plastika), jejíž součástí byla ve všech případech rovněž i tonzilektomie.

U všech pacientů byla před výkonem odebrána srážlivá krev standardní venepunkcí do dvou zkumavek Vacuette (GBO, Kremsmunster, Austria). Následně bylo odděleno sérum a zamraženo v kapalném dusíku a uskladněno v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

V úvodu chirurgického výkonu byly odebrány tkáňové vzorky tonzilárních karcinomů a tonzil za přísně sterilních podmínek. Vzorky byly vloženy do transportního media pro kultivační průkaz (thioglykolátový bujon) a do Microtest^R M4RT transport media (Remel Inc., USA) pro PCR zpracování. Dále byly odebrány tkáňové vzorky, které byly fixovány ve 4% paraformaldehydu.

Při pozitivním průkazu HP v orofaryngu bylo 20 osob vyšetřeno ureázovým dechovým testem (UBT) na přítomnost HP v žaludku. U osmi byl výsledek pozitivní. Následně 6 z nich podstoupilo gastrokopii a byla provedena genotypizace žaludečního HP.

Vyšetření vzorků

- A) detekce specifických sérových protilátek proti HP ve třídách IgG, IgA, IgM metodou ELISA
- B) tkáň – detekce přítomnosti HP - kultivace, PCR
- C) vyšetření žaludečního HP – UBT, gastrokopie, PCR
- D) cytokinový profil ze séra – Human cytokine microarray
- E) detekce EGF a TGF-beta 1 v séru - metodou ELISA
- F) iNOS, eNOS, kaspázy 3 ve tkáních – imunohistochemie

4. VÝSLEDKY

Sérologie

Protilátky byly zjišťovány celkem u 104 osob. Z toho 41 ve skupině nádorové, 38 ve skupině chronické tonsilitidy a 25 ve skupině OSAS. U skupiny nádorové byla zjištěna séropozitivita u 32 osob (78,05%), u skupiny pacientů s chronickou tonsilitidou u 13 osob (34,21%). Rovněž vysoká pozitivita byla nalezena u skupiny OSAS – u 18 osob (72%). Statisticky významné rozdíly byly nalezeny mezi skupinou nádorovou a skupinou chronické tonsilitidy (Chí - kvadrát test: $p=0.0001$) a mezi skupinou OSAS a skupinou chronické tonsilitidy (Chí - kvadrát test: $p=0.0049$).

Kultivace

Materiál na kultivaci byl nabrán celkem u 45 pacientů (11 osob. s karcinomem, 22 s chronickou tonsilitidou a 12 s OSAS). Kultivačně pozitivní průkaz byl zjištěn pouze ve 3 vzorcích – 1x karcinom, 2x tonsilitida.

PCR

Materiál pro PCR diagnostiku byl získán celkem od 56 osob (23 karcinomů, 20 chronických tonsilitid a 13 OSAS). Přítomnost HP ve tkáni byla real-time PCR metodou zjištěna u 17 nádorů (73,91%), 14 tonsilitid (70,0%) a 9 OSAS (69,23%).

Statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny mezi skupinou nádorovou a skupinou chronické tonzilitidy (Chí - kvadrát test: $p=0.7754$), mezi skupinou OSAS a skupinou chronické tonzilitidy (Chí - kvadrát test: $p=0.9625$), ani mezi skupinou nádorovou a OSAS (Chí - kvadrát test: $p=0.7632$).

Genotypizace orofaryngeálních kmenů

Výsledky ukazují převahu s1b (56,7%) a m2 (59,5%) alel *vacA* genu a jen ojedinělou přítomnost *cagA* genu (13,5%) v orofaryngeálních genotypích. Jako velice vzácný lze hodnotit kmen HP s genotypem s2/m1. Ve třech případech byl detekován smíšený genotyp HP: 1x s1a/s1b, 1x s1a/s2 a 1x m1/m2.

Porovnání výsledků PCR a sérologií

Významný je nález u celkem 12 osob (3 s karcinomem, 7 s tonsilitidou a 2 s OSAS), které měli PCR pozitivitu v orofaryngu bez detekovatelných protilátek v séru. Ve dvou případech chronické tonsilitidy byla rovněž nalezena kultivační pozitivita bez přítomnosti protilátek v séru.

UBT

Z pacientů, u kterých byla prokázána přítomnost orofaryngeálního HP bylo vybráno 20 (9 karcinomů, 6 tonzilitid a 5 OSAS), u kterých byla vyšetřena přítomnost žaludeční infekce pomocí UBT. Pouze u 8 z nich byla nalezena žaludeční pozitivita. U šesti z nich byla dále provedena gastroscopie s odběrem vzorků ke genotypizaci žaludečního HP. Jeden pacient gastroscopii odmítl a jedna pacientka podstoupila eradikaci na jiném pracovišti.

Porovnání orofaryngeálních a žaludečních genotypů

Gastroscopicky byla přítomnost HP potvrzena u všech 6 osob. U 4 z nich byly nalezeny slizniční změny odpovídající chronické gastritidě. Všichni pacienti však byli klinicky bez žaludečních obtíží. Porovnání žaludečních a orofaryngeálních genotypů ukázalo významné rozdíly u stejných osob. Tři pacienti měli v žaludku *cagA* pozitivní kmen HP, ale negativní v orofaryngu. Dva z nich rovněž vykazovali rozdíly v signální sekvenci *vacA* genu. U 1 pacienta byly nalezeny rozdíly pouze v signální sekvenci *vacA*. Dva pacienti nesli v žaludku a orofaryngu stejný kmen HP.

Cytokiny

Analýza cytokinů v séru

Použité arraye neprokázaly významné rozdíly v sérové expresi panelu cytokinů v porovnání diagnóz bez závislosti na přítomnosti HP infekce.

Analýza sérových hladin EGF v závislosti na diagnóze neukázala statisticky významné rozdíly ($p=0,3638$, analýza rozptylu ANOVA).

Porovnání sérových hladin EGF neukázalo statisticky významné rozdíly v závislosti na přítomnosti protilátek proti HP u karcinomů ($p=0,5984$, ANOVA), tonzilitid ($p=0,6429$, ANOVA) ani OSAS ($p=0,2334$, ANOVA) Při porovnávání skupin v závislosti na PCR průkazu HP ve tkáni orofaryngu rovněž nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly u karcinomů ($p=0,9846$, ANOVA), tonzilitid ($p=0,7606$, ANOVA), ani OSAS ($p=0,2285$, ANOVA).

Analýza sérových hladin TGF-beta 1 v závislosti na diagnóze neukázala statisticky významné rozdíly ($p=0,6545$, analýza rozptylu ANOVA).

Porovnání sérových hladin TGF-beta 1 neukázalo statisticky významné rozdíly v závislosti na přítomnosti protilátek proti HP u karcinomů ($p=0,7028$, ANOVA), tonzilitid ($p=0,3621$, ANOVA) ani OSAS ($p=0,1319$, ANOVA). Při porovnávání skupin v závislosti na PCR průkazu HP ve tkáni orofaryngu rovněž nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly u karcinomů ($p=0,5757$, ANOVA), tonzilitid ($p=0,6993$, ANOVA), ani OSAS ($p=0,2324$, ANOVA).

Detekce iNOS, eNOS a kaspázy 3 ve tkáni

Zpracováno bylo celkem 17 vzorků tonzilárního karcinomu, 11 vzorků chronické tonsilitidy a 8 vzorků pacientů s OSAS s předpokládanou zdravou tonsilární tkání.

Expresie iNOS byla nalezena v nádorové tonsilární tkáni, stejně tak jako ve tkáni chronické tonsilitidy a klinicky zdravých tonsil. Nejvyšší iNOS pozitivita byla nalezena ve tkáni chronické tonsilitidy – v cytoplasmě endotelových buněk drobných cév lymfatické tkáně. Produkce iNOS v nádorové tkáni byla prokázána ve velkém množství v cytoplasmě endotelových buněk malých vén a méně pak v cytoplasmě mononukleárů v pojivové tkáni. Lokalizace iNOS v klinicky zdravé

tonsilární tkáni byla ozřejmena v cytoplasmě endotelových buněk malých vén v lymfatických folikulech.

Nejvyšší pozitivita eNOS byla nalezena v endoteliálních buňkách kapilár vysoce vaskularizovaných oblastí tonsilárního karcinomu. U chronické tonsilitidy byla nalezena variabilní exprese eNOS v cévách tonsilární lamina propria, silná eNOS reakce byla nalezena ve venulách s vysokým endotelem. V klinicky zdravé tonsilární tkáni byla nalezena exprese eNOS v buňkách povrchového epitelu a ve velkém množství v cytoplasmě endoteliálních buněk drobných vén.

Pouze ojedinělé buňky produkující kaspázu 3 byly nalezeny v tonsilárních karcinomech. U chronické tonsilitidy byla nalezena vyšší exprese kaspázy 3 v zárodečných centrech lymfatických folikulů, ale pouze slabá pozitivita v interfolikulární zóně a povrchovém dlaždicovém epitelu tonsil. Ve zdravé tonsilární tkáni byla nalezena exprese kaspázy 3 jen ojediněle v některých vzorcích v lymfatických folikulech

5. DISKUSE

Jedním z cílů předkládané disertační práce bylo odpovědět na otázku možné kolonizace lymfatické tkáně orofaryngu HP. V literatuře dosud nebyly podány přesvědčivé důkazy o helicobacterové infekci této lokalizace. Na rozdíl od zubního plaku, který je nyní považován za možný extragastrický rezervoár HP, práce dosud publikované zabývající se detekcí orofaryngeální infekce HP přinesly rozporuplné výsledky (Skinner et al., 2001; Cirak et al., 2003). Detekce orofaryngeálního HP je udávána v rozmezí 0-90% (Dowsett and Kowolik, 2003). Vzhledem k tomu, že byly různými autory použity rozdílné metody detekce, nebylo možné dojít k hodnotitelným závěrům. Jako nevhodné detekční metody pro diagnostiku orofaryngeálního HP se jeví často používané testy RUT a CLO. Přítomnost jiných ureázu-produkujících bakteriálních kmenů v orofaryngu může vést k falešně pozitivním výsledkům. Kultivace se ukázala jako velmi náročná a málo odolná vůči zevním vlivům, které mohou zcela znemožnit úspěšnou detekci. Autorem použitá detekční metoda real-time PCR může být považována za metodu s dostatečnou senzitivitou i specificitou (Schabereiter-Gurtner et al., 2004). Dosažené výsledky jednoznačně prokazují přítomnost HP v lymfatické tkáni

orofaryngu. Faktem zůstává, že PCR metodika umožňuje zjistit přítomnost bakteriální DNA, nelze však určit zda se jedná o DNA pocházející z živých nebo mrtvých bakterií. Doplnující výsledky kultivace i přes velmi nízké počty pozitivních výsledků svědčí pro možnou přítomnost viabilních a dělení schopných bakterií. Nízké počty pozitivních kultur lze vysvětlit velkou citlivostí HP k nepříznivým vlivům během transportu vzorků i během manipulace v laboratoři. Rovněž významné osídlení tkáně orofaryngu ostatními bakteriálními kmeny může mít značný vliv na neúspěšnost kultivace HP. Použitá PCR metodika umožňuje provést nejen detekci přítomnosti HP infekce, ale rovněž i genotypizaci kmenů přímo ve tkáni.

Při porovnání počtů osob s prokázanou orofaryngeální infekcí HP mezi různými diagnózami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. Původní předpoklad, že by se orofaryngeální infekce HP mohla podílet na orofaryngeální karcinogenezi jako přímý mutagen se nepodařilo potvrdit. Vzhledem k vysokým procentům pozitivních výsledků u chronického zánětu, ale i u OSAS skupiny, u které předpokládáme zdravou tonsilární tkáň, se zdá být přímé karcinogenní působení HP v této lokalizaci nepravděpodobné. Analogická situace však nastává i v žaludku, kdy promořenost obyvatelstva HP je udávána mezi 40-80 % (Bures et al., 2006), vážné žaludeční obtíže jako je gastroduodenální vředová choroba nebo žaludeční karcinom však má jen 10 -15% infikovaných.

Virulence kmenů HP se liší podle produkce toxinů. Tato produkce je dána přítomností genů faktorů virulence, z nichž nejdůležitější jsou *cagA* a *vacA* gen. Hlavní karcinogenní působení HP je dáváno do souvislosti s přítomností *cagA* genu a kombinací s1/m1 alel *vacA* genu (Ferreira et al., 2008). Metaanalýza provedená Huangem et al. (2003) ukázala, že riziko vzniku žaludečního karcinomu je dvakrát vyšší u osob, které mají protilátky proti CagA. Provedená analýza orofaryngeálních genotypů ukázala převahu s1/m2 kombinace alel *vacA* genu. *cagA* gen byl nalezen pouze v 5 (13,5%) případech. To znamená, že v oblasti orofaryngu převažovaly kmeny HP vyznačující se menší virulencí. V porovnání s geografickou epidemiologickou studií žaludečních genotypů HP, kterou provedli van Doorn et al. (1999) se

distribuce jednotlivých alel *vacA* genu a přítomnost *cagA* genu výrazně liší. Jako převažující alela signální sekvence *vacA* genu je udávána v Evropě alela s1a (88,8%) a alela střední sekvence m1 (54,5%). *cagA* gen byl nalezen v 72,1% vzorků. Výsledky analýzy orofaryngeálních genotypů však ukazují převahu s1b (56,7%) a m2 (59,5%) alel *vacA* genu a jen ojedinělou přítomnost *cagA* genu v orofaryngeálních genotypích. Jako velice ojedinělý nález lze hodnotit nalezený kmen HP s genotypem s2/m1.

Detekce žaludeční infekce HP u osob s prokázanou přítomností HP v orofaryngu pomocí UBT ukázala, že HP může v orofaryngu existovat nezávisle na žaludeční infekci. Z dvaceti vyšetřených osob se zjištěnou přítomností HP v orofaryngu byla žaludeční infekce nalezena pouze u osmi. UBT je považován za nejpřesnější neinvazivní test k detekci žaludečního HP. Pozitivní výsledky UBT byly potvrzeny PCR diagnostikou ze tkáňových vzorků žaludeční sliznice získaných při gastrokopii. Porovnání genotypů HP z orofaryngu a žaludku u stejných osob ukázalo, že jedinec může hostit více než jeden kmen HP v různých lokalizacích. Rozdílly byly nalezeny v přítomnosti *cagA* genu i ve struktuře *vacA* genu.

První práce zabývající se porovnáním orálních a žaludečních kmenů HP používaly restriční endonukleázovou analýzu, metodu DNA fingerprintingu a PCR analýzu polymorfismů jednovláknové konformace (SSCP) (Zhang and Lu, 1997; Hu et al., 2002). Nalezeny byly shodné kmény HP v žaludku a dutině ústní. První porovnání žaludečních a orálních kmenů HP PCR genotypizací provedli Wang et al. (2002) a následně i Burgers et al. (2008). Pomocí PCR byly nalezeny v obou případech rozdílné genotypy v žaludku a dutině ústní.

Pacienti vybraní k detekci orofaryngeálního HP byli selektováni ze skupiny osob s orofaryngeální patologií a byla u nich doplněna detekce HP v žaludku, na rozdíl od výše citovaných prací, u kterých byli pacienti selektováni ze skupiny s primárně žaludečními obtížemi, kteří podstoupili gastrokopii a následně u nich byla doplněna orální detekce HP. Dle literatury je toto první případ detekce žaludečních genotypů u osob bez žaludečních obtíží. Rozdíl je rovněž v použití tkáňových vzorků lymfatické tkáně orofaryngu. Ve všech výše zmíněných pracích byl HP

detekován ve slinách nebo v zubním plaku. Lze usuzovat, že sliny mohou být zdrojem žaludečního HP, který se do dutiny ústní může dostávat např. cestou gastroezofageálního refluxu. Oproti tomu v tonsilární tkáni předpokládáme trvalou kolonizaci nezávislou na žaludeční infekci. Tato hypotéza byla podpořena výsledky UBT, kdy žaludeční infekce byla nalezena pouze u 8 z 20 osob s prokázanou přítomností HP v orofaryngu.

Burgers ve své práci uvádí nález 10 případů s pozitivním HP ve slinách, bez prokazatelných specifických protilátek proti HP v séru. Toto je rovněž ve shodě s výsledky dosaženými v této práci, kdy byl nalezen HP v orofaryngu u 12 osob bez prokazatelné protilátkové odpovědi. Vysvětlením by mohla být časná detekce HP po primární infekci, kdy ještě nedošlo k protilátkové odpovědi. Bylo zjištěno, že protilátky vznikají až několik měsíců po infekci (Hep, 2003). Dále musíme zvažovat možnost, že HP kolonizuje oblast orofaryngu, aniž by vyvolával imunitní odpověď hostitele. Této hypotéze napovídá fakt, že u 9 z 12 osob bez protilátkové odpovědi byl v orofaryngu nalezen méně virulentní genotyp HP (s1/m2). Dalším vysvětlením je možná přítomnost kokoidních forem HP. Jedná se o viabilní formu bakterie, kterou nelze kultivovat konvenčními mikrobiologickými technikami a vyznačuje se sníženou virulencí. HP se v této formě vyskytuje v nepříznivém prostředí (Andersen and Rasmussen, 2009).

Dosud nebyla ani uspokojivě vyřešena otázka přenosu HP. Pokud uvažujeme cestu orálně- orální či fekálně-orální, lze předpokládat nález shodného kmene HP v orofaryngu a žaludku u stejné osoby. K nálezům rozdílných genotypů v obou lokalizacích zatím chybí přesné vysvětlení. Jednou z možností by mohla být inokulace směsí kmenů HP a následně jejich rozdílné osídlení různých oblastí dle citlivosti kmenů. Lze předpokládat, že oblast orofaryngu je pro HP méně příznivá a dokáží ji osídlit pouze odolnější kmeny. Za jeden z nepříznivých faktorů růstu a množení HP byla označena přítomnost jiných bakteriálních kmenů, které dokázaly růst HP zastavit při pokusech *in-vitro* (Ishihara et al., 1997). V dutině ústní a orofaryngu lze předpokládat osídlení mnoha různými bakteriálními kmeny.

V literatuře publikovaná epidemiologická data o prevalenci infekce HP se často opírají o sérologickou detekci specifických protilátek proti HP. Prevalence infekce v České republice je udávána 45–83 % (Bures et al., 2006). Přítomnost protilátek proti HP byla dávana do souvislosti se žaludeční infekcí. Data získaná v předkládané práci však svědčí o možnosti přítomnosti HP infekce v jiných lokalizacích bez závislosti na žaludeční infekci. Tento fakt je třeba zvažovat při budoucích epidemiologických studiích, kdy je třeba hodnotit nejen přítomnost protilátek, ale i zjišťovat přesnou lokalizaci infekce.

Poškození sliznice vyvolané HP je výsledkem přímého působení bakteriálních toxinů a rovněž také působení zánětlivé odpovědi imunitního systému hostitele vyvolané bakterií. Chronický zánět s převažující Th1 odpovědí nepřímo přispívá k poškození sliznice. Th1 polarizované lymfocyty produkující IFN – gama a spolu s aktivovanými NK buňkami hrají důležitou roli při rozvoji závažných patologií. Infekce HP v žaludeční sliznici je spojena s produkcí prozánětlivých i imunomodulačních cytokinů. Byly popsány změny v sekreci IL-8, IL-1-beta, IL-6, IL-12, IL-18, TNF-alfa (Stromberg et al., 2003). Tyto cytokiny jsou produkovány buňkami imunitního systému a rovněž epitelovými buňkami sliznice. Tento fakt je dobře prozkoumán a popsán v žaludeční sliznici. Předpokládalo se, že zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů v žaludeční sliznici vyvolaná HP by mohla ovlivnit i hladiny cirkulujících sérových cytokinů a mít tak nepřímo i systémové účinky. Nález publikované v literatuře dosud tento předpoklad nepotvrdily. Bayraktaroglu et al. (2004) neprokázali elevaci sérových hladin IL6, IL 8 a TNF-alfa u HP infikovaných osob. Russo et al. (2001) prokázali zvýšené hladiny TNF-alfa v séru osob infikovaných HP. U IL8, IL10 a IFN-gama nebylo prokázáno zvýšení sérových hladin v závislosti na infekci HP. Di Bonaventura et al. (2007) nezjistili elevaci sérových hladin IL1, IL6, IL8 a TNF-alfa u osob s infekcí HP. S tím souhlasí i výsledky získané autorem předkládané disertační práce, kdy byla použita RayBio Human Cytokine Antibody Array 3 k detekci cytokinového profilu. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v sérových hladinách jednotlivých cytokinů u osob s prokázanou infekcí

HP a osob neinfikovaných, rovněž nebyly nalezeny významné rozdíly při porovnání skupin podle diagnóz.

V souvislosti s poškozením žaludeční sliznice, zvýšenou proliferací a nádorovou transformací žaludečního epitelu byly popsány rovněž změny v expresi EGF, EGFR, TGF-beta (Stromberg et al., 2003) související s infekcí HP. Tyto cytokiny se významně podílí i při karcinogenezi v oblasti hlavy a krku (Rubin Grandis et al., 1998). Aktivace EGFR autokrinní stimulací vede ke zvýšení proliferace nádorových buněk, inhibici apoptózy, zvýšení invazivity nádoru, aktivaci angiogeneze, metastazování a vzniku rezistence k radioterapii i chemoterapii. Tumory se zvýšenou expresí EGFR jsou spojeny s horší prognózou. (Kopp et al., 2003). V nádorových buňkách byly popsány mutace signální dráhy TGF-beta. Tyto mutace způsobují rezistenci nádorových buněk k inhibici růstu zprostředkované TGF-beta a tím umožňují nekontrolovanou proliferaci buněk. Zvýšení produkce TGF-beta v nádorových buňkách zvyšuje jejich proteolytickou aktivitu a tím i jejich invazivitu (Alleva et al., 1995).

Zvýšená exprese těchto molekul ve sliznici žaludku vlivem infekce HP byla popsána (Romero-Adrian et al., 2009). Možnost, že by zvýšená žaludeční produkce ovlivňovala i hladiny v séru a tím by mohla ovlivňovat nádorové procesy systémově, nebyla dosud zkoumána. Stejně tak nebyla zkoumána lokální produkce cytokinů v oblasti orofaryngu, kde byla prokázána přítomnost HP. Předkládaná disertační práce byla zaměřena na detekci sérových hladin EGF a TGF-beta 1, k zjištění, zda infekce HP může elevovat tyto hladiny systémově. Výsledky ukazují, že nedochází k statisticky významnému zvýšení hladiny cirkulujících cytokinů v porovnání osob HP pozitivních a HP negativních. Rovněž porovnání mezi jednotlivými skupinami podle diagnóz neukázalo významné rozdíly. Lze z toho usuzovat, že tyto cytokiny působí lokálně, tedy parakrinně nebo autokrinně a nemají systémový účinek. Další výzkum by se proto měl soustředit na zjištění produkce těchto molekul, lokálně v tkáni orofaryngu v souvislosti s HP infekcí.

Ve tkáni byla zjišťována exprese iNOS, eNOS a kaspázy 3. Cílem bylo nalézt změny v lokalizaci exprese těchto molekul v závislosti na diagnóze. Při rozvoji nádorového bujení se spolupodílí dva významné

děje. Jedním z nich je nekontrolovaný růst buněk, následovaný vystupňovanou neoangiogenezí. tento proces je mediován NO, syntetizovaným NO syntázami. Druhým procesem je zabrzdění programované smrti – apoptózy. Výkonným enzymem apoptózy je kaspáza 3. Tumory nemohou přesáhnout objem 1-2 mm³ bez tvorby nových cév - neoangiogeneze. Musí proto produkovat angiogenní růstové faktory. Angiogeneze potencovaná NO hraje významnou roli při progresi růstu tumorů a rozvoji uzlinových metastáz. NO je signální molekulou, produkovaná NO syntázami v endotelových buňkách cév zásobujících tkáň tumoru. Množství produkovaných NO syntáz ukazují intenzitu angiogeneze (Gallo et al., 1998). V předkládané disertační práci byla porovnávána exprese dvou NO syntáz (iNOS a eNOS) morfologicky. Ve shodě s dosud publikovanými pracemi, byla nalezena vysoká intenzita angiogeneze u tonzilárních karcinomů, kde byla popsána silná exprese iNOS i eNOS v endotelových buňkách. Expese eNOS ve venulách s vysokým endotelem v lamina propria u chronické tonsilitidy naznačuje možnou roli v regulaci cirkulace lymfocytů.

Inhibice apoptózy je považována za jeden z hlavních faktorů obrany nádorových buněk před imunitním systémem organismu. Kaspáza 3 je markerem apoptózy (Earnshaw et al., 1999). Apoptóza byla ozřejmena jen v ojedinělých buňkách tonzilárního karcinomu. U chronické tonsilitidy byly apoptotické buňky nalezeny převážně ve skupinách maturujících B-lymfocytů. Jen ojedinělé apoptotické buňky byly nalezeny ve zdravé tonsilární tkáni.

Ze získaných výsledků vyplývá, že lokalizace exprese iNOS, eNOS a kaspázy 3 se u karcinomu, chronického zánětu a zdravé tonsilární tkáni významně liší. Tento nálezn by mohl být využitelný jako morfologický marker sloužící k rozlišení chronického zánětu od maligních procesů.

V budoucnu bude vhodné zaměřit pozornost na lokální působení HP v lymfatické tkáni orofaryngu. Změny v expresi některých cytokinů způsobené HP, které byly popsány v žaludeční sliznici lze předpokládat i v tkáni orofaryngu. V případě, že v orofaryngeální tkáni mohou přežívat i virulentní kmeny HP, lze očekávat translokaci toxinů do buněk

orofaryngu a následnou cytokinovou odpověď shodnou s odpovědí slizničních buněk žaludku.

6. ZÁVĚRY

Nejdůležitější výsledky disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- A. Bylo potvrzeno, že HP může kolonizovat orofaryngeální lymfatickou tkáň. Byla nalezena vysoká incidence orofaryngeální infekce HP nejen u karcinomů, ale i u benigních onemocnění orofaryngu. Možný vliv HP při rozvoji orofaryngeální karcinogenezi se nepodařilo prokázat.
- B. Genotypizace orofaryngeálních kmenů prokázala rozdíly oproti převažujícím kmenům nalézaným v žaludku. Kmeny se liší zejména nižší přítomností *cagA* genu. Rovněž byly převážně nalezeny kmeny HP nesoucí alely *vacA* genu, které jsou považovány za méně virulentní. Bylo prokázáno, že infekce HP může být v orofaryngu přítomná nezávisle na žaludeční infekci.
- C. Analýza cytokinové odpovědi v séru pacientů s orofaryngeální infekcí HP neprokázala významné rozdíly v porovnání s pacienty HP negativními. Lze říci, že orofaryngeální infekce HP nezvyšuje systémovou cytokinovou odpověď.
- D. Analýza exprese iNOS, eNOS a kaspázy 3 prokázala rozdílnou tkáňovou expresi těchto molekul při porovnání různých diagnóz. Rozdíly byly nejpatrnější u eNOS a kaspázy 3. V budoucnu by mohly tyto molekuly být použity jako marker k rozlišení benigních a maligních onemocnění při histopatologické diagnostice.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Allaker, R. P., Young, K. A., Hardie, J. M., Domizio, P., Meadows, N. J. (2002) Prevalence of helicobacter pylori at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol.* **51**, 312-317.
- Alleva, D. G., Walker, T. M., Elgert, K. D. (1995) Induction of macrophage suppressor activity by fibrosarcoma-derived transforming growth factor-beta 1: contrasting effects on resting and activated macrophages. *J Leukoc Biol.* **57**, 919-928.
- Andersen, L. P., Rasmussen, L. (2009) Helicobacter pylori-cocoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **56**, 112-115.
- Bayraktaroglu, T., Aras, A. S., Aydemir, S., Davutoglu, C., Ustundag, Y., Atmaca, H., Borazan, A. (2004) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 are not increased in dyspeptic patients with Helicobacter pylori-associated gastritis. *Mediators Inflamm.* **13**, 25-28.
- Bures, J., Kopacova, M., Koupil, I., Vorisek, V., Rejchrt, S., Beranek, M., Seifert, B., Pozler, O., Zivny, P., Douda, T., Kolesarova, M., Pinter, M., Palicka, V., Holcik, J. (2006) Epidemiology of Helicobacter pylori infection in the Czech Republic. *Helicobacter.* **11**, 56-65.
- Burgers, R., Schneider-Brachert, W., Reischl, U., Behr, A., Hiller, K. A., Lehn, N., Schmalz, G., Ruhl, S. (2008) Helicobacter pylori in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci.* **116**, 297-304.
- Cirak, M. Y., Ozdek, A., Yilmaz, D., Bayiz, U., Samim, E., Turet, S. (2003) Detection of Helicobacter pylori and its CagA gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **129**, 1225-1229.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Pompilio, A., Zappacosta, R., Piccolomini, M., Neri, M. (2007) Serum and mucosal cytokine profiles in patients with active Helicobacter pylori and ischemic heart disease: is there a relationship? *Int J Immunopathol Pharmacol.* **20**, 163-172.
- Dowsett, S. A., Kowolik, M. J. (2003) Oral Helicobacter pylori: can we stomach it? *Crit Rev Oral Biol Med.* **14**, 226-233.

- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* **68**, 383-424.
- Ferreira, A. C., Isomoto, H., Moriyama, M., Fujioka, T., Machado, J. C., Yamaoka, Y. (2008) Helicobacter and gastric malignancies. *Helicobacter.* **13 Suppl 1**, 28-34.
- Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A., Ziche, M. (1998) Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* **90**, 587-596.
- Hatakeyama, M. (2006) The role of Helicobacter pylori CagA in gastric carcinogenesis. *Int J Hematol.* **84**, 301-308.
- Hep, A. (2003) Současné možnosti diagnostiky Helicobacter pylori. *MEDICÍNA PO PROMOCI.* **4**, 6-8.
- Hu, W., Cao, C., Meng, H., Zhang, J., Ma, D., Zhang, L. (2002) Detection and analysis of Helicobacter pylori in oral cavity and stomach from chronic gastritis patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **82**, 1037-1041.
- Huang, J. Q., Zheng, G. F., Sumanac, K., Irvine, E. J., Hunt, R. H. (2003) Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology.* **125**, 1636-1644.
- Ishihara, K., Miura, T., Kimizuka, R., Ebihara, Y., Mizuno, Y., Okuda, K. (1997) Oral bacteria inhibit Helicobacter pylori growth. *FEMS Microbiol Lett.* **152**, 355-361.
- Israel, D. A., Peek, R. M. (2001) pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther.* **15**, 1271-1290.
- Kopp, R., Rothbauer, E., Mueller, E., Schildberg, F. W., Jauch, K. W., Pfeiffer, A. (2003) Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor receptor levels. *Dis Colon Rectum.* **46**, 1391-1399.
- Mobley, H. L. (1996) Defining Helicobacter pylori as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. *Am J Med.* **100**, 2S-9S; discussion 9S-11S.
- Portal-Celhay, C., Perez-Perez, G. I. (2006) Immune responses to Helicobacter pylori colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci (Lond).* **110**, 305-314.
- Romero-Adrian, T. B., Leal-Montiel, J., Monsalve-Castillo, F., Mengual-Moreno, E., McGregor, E. G., Perini, L., Antunez, A. (2009)

- Helicobacter pylori: Bacterial Factors and the Role of Cytokines in the Immune Response. *Curr Microbiol.*
- Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., Tweardy, D. J. (1998) Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* **90**, 824-832.
- Russo, F., Jirillo, E., Clemente, C., Messa, C., Chiloiro, M., Riezzo, G., Amati, L., Caradonna, L., Di Leo, A. (2001) Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by Helicobacter pylori (H. pylori). *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **23**, 13-24.
- Schabereiter-Gurtner, C., Hirschl, A. M., Dragosics, B., Hufnagl, P., Puz, S., Kovach, Z., Rotter, M., Makrithathis, A. (2004) Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* **42**, 4512-4518.
- Skinner, L. J., Winter, D. C., Curran, A. J., Barnes, C., Kennedy, S., Maguire, A. J., Charles, D. A., Timon, C. I., Burns, H. P. (2001) Helicobacter pylori and tonsillectomy. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* **26**, 505-509.
- Stromberg, E., Edebo, A., Svennerholm, A. M., Lindholm, C. (2003) Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of Helicobacter pylori-infected duodenal ulcer patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**, 116-124.
- Šterzl, I. (2007) Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře. Praha 1: Karolinum.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Megraud, F., Pena, S., Midolo, P., Queiroz, D. M., Carneiro, F., Vanderborght, B., Pegado, M. D., Sanna, R., De Boer, W., Schneeberger, P. M., Correa, P., Ng, E. K., Atherton, J., Blaser, M. J., Quint, W. G. (1999) Geographic distribution of vacA allelic types of Helicobacter pylori. *Gastroenterology.* **116**, 823-830.
- Wang, J., Chi, D. S., Laffan, J. J., Li, C., Ferguson, D. A., Jr., Litchfield, P., Thomas, E. (2002) Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. *Dig Dis Sci.* **47**, 1850-1856.
- Zhang, Y., Lu, X. (1997) [Detection and differentiation of Helicobacter pylori from gastric biopsy and saliva by PCR-SSCP]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* **36**, 446-449.

8. PŘÍLOHA

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce s IF

1. Pavlík E, Lukes P, Potuznikova B, Astl J, Hrda P, Soucek A, Matucha P, Dosedel J, Sterzl I. ***Helicobacter pylori* isolated from patients with tonsillar cancer or tonsillitis chronica could be of different genotype compared to isolates from gastrointestinal tract.** Folia Microbiol (Praha) 2007;52:91-4. **IF 0,989**
2. Lukeš P., Astl J., Pavlík E., Potužníková B., Šterzl I., Betka J., ***Helicobacter pylori* in tonsillar and adenoid tissue and its possible role in oropharyngeal carcinogenesis.** Folia Biol (Praha) 2008;54:33-39. **IF 1,140**
3. Lukes P, Pácová H, Kucera T, Veselý D, Martínek J, Astl J., **Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and caspase-3 in tonsillar cancer, chronic tonsillitis and healthy tonsils.** Folia Biol (Praha). 2008;54(5):141-5. **IF 1,140**

bez IF

1. Lukeš P., Astl J., Šterzl I., Potužníková B., Veselý D., Betka J. **Může být *Helicobacter pylori* jedním z etiologických faktorů při vzniku nádorů orofaryngu?** Prakt. Lék. 86, 2006, č. 11, s. 627-630
2. Nártová E., Lukeš P., Pavlík E., Šterzl I., Astl J., Betka J., **Přítomnost *Helicobacter pylori* v orofaryngu a její vztah k žaludeční infekci,** Otorinolaryng. a Foniatr. (Prague), 58, 2009, č. 2, s. 97-101
3. Katra R., Kabelka Z., Lukeš P., Astl J., Jurovčík M., **Přítomnost *Helicobacter pylori* v lymfatické tkáni nosohltanu a jeho**

možná souvislost se vznikem adenoidních vegetací,
Otorinolaryng. a Foniatr. (Prague), 58, 2009, č. 2, s. 102-105

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

1. Kastner J., Zábrodský M., Astl J., Zvěřina E., Lukeš P., Betka J.,
**Videokymografie a digitální kymografie, kymografické
nálezy u pacientů po thyroidektomii,** Endoskopie 2009,
18(2): 64-66
2. Betka J., Zvěřina E., Chovanec M., Kluh J., Lukeš P., Kraus J.,
Lisý J., **Minimálně invazivní endoskopická a
endoskopicky asistovaná chirurgie vestibulárního
schwannomu,** Endoskopie 2009, 18(2): 67-71
3. Betka J., Astl J., Chovanec M., Lukeš P., Zábrodský M., Plzák J.,
**Minimálně invazivní endoskopická chirurgie štítné žlázy
a příštítných tělísek,** Endoskopie 2009, 18(3): 112-115

