

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**MUDr. Eva Nártová**

Detekce a genotypizace kmenů *Helicobacter pylori* ve Waldeyerově lymfatickém okruhu a jeho vztah ke vzniku patologií v této oblasti

Detection and genotypisation of *Helicobacter pylori* strains in Waldeyer's lymphatic tissue and its relationship to the formation of pathologies in this area

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

ŠKOLITEL: Prof. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

**PRAHA 2016**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 16.12.2016

MUDr. EVA NÁRTOVÁ

Identifikační záznam:

**Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.**

PŘÍJMENÍ, Jméno. *Název práce. [Překlad názvu práce do angličtiny]*. Místo vydání, rok vydání. Počet stran, počet příloh. Typ závěrečné práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika / Ústav 1. LF UK 2008. Vedoucí závěrečné práce/Školitel.

NÁRTOVÁ, Eva. *Detekce a genotypizace kmenů Helicobacter pylori ve Waldeyerově lymfatickém okruhu a jeho vztah ke vzniku patologií v této oblasti. [Detection and genotyping of Helicobacter pylori strains in Waldeyer's lymphatic tissue and its relationship to the formation of pathologies in this area]*. Praha, 2016. 85, 5. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF a UK a FN v Motole. Prof. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

## Abstrakt

Práce se zabývá studiem přítomnosti *Helicobacter pylori* (HP) v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu u skupiny dospělých a dětských pacientů a možnou souvislostí se vznikem benigních onemocnění v této oblasti (chronická tonzilitida, adenoidní vegetace a syndrom obstrukční spánkové apnoe-OSAS) a se vznikem karcinomu tonzily.

V naší práci jsme potvrdili hypotézu, že HP se nachází v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu stejně tak jako v žaludku a lymfatická tkáň orofaryngu a epifaryngu tak plní roli extragastrického zdroje HP. Předpokládá se, že v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu působí infekce HP podobnými imunitními a zánětlivými procesy jako v žaludku, neboť se jedná o lymfatickou tkáň vázanou na sliznici.

V dizertační práci jsme pomocí metody real-time PCR zjistili vysoký výskyt DNA HP v adenoidní a tonzilární tkáni. Ve skupině benigních onemocnění byly nejčastěji detekovány genotypy Cag-VacAs1bm1 a CagA-VacAs1bm2. Ve skupině pacientů s karcinomem tonzily byl nejčastěji detekován genotyp CagA-VacAs1bm1. Genotypizací zjištěné kmeny HP vykazovaly rozdíly v porovnání s převládajícími kmeny, které lze nejčastěji nalézt v žaludku. Prokázané kmeny se liší především menší expresí CagA genu. Byly tak detekovány méně virulentní kmeny. Předpokládá se, že dlouhodobá kolonizace lymfatické tkáně orofaryngu a epifaryngu méně virulentními kmeny může vést k ovlivnění imunitních mechanismů a teoreticky k nástupu procesu zánětlivého procesu a ke kancerogenezi. Korelace mezi výskytem určitých typů genotypů HP a chronickým zánětem či maligním onemocněním prokázána nebyla.

Otázka eradikace HP u pacientů s PCR pozitivitou a současnou sérologickou pozitivitou infekce v naší práci potvrzena nebyla a je předmětem dalších studií. Sérologická metoda nemá dobrou výpovědní hodnotu, zda se jedná o recentní či již proběhlou infekci HP a nelze rovněž zjistit, v jaké lokalizaci infekce proběhla/probíhá. HP protilátky se nevytváří v organismu hned po vzniku infekce a zároveň přetrvávají v organismu poměrně dlouho.

Výsledky dosažené v této práci přispívají k poznání významu HP infekce u dospělých a dětských pacientů a pokládají rovněž otázky pro další výzkum.

**Klíčová slova:** *Helicobacter pylori*, tonzily, adenoidní vegetace, PCR, genotyp

## **Abstract**

The aim of this study was to reveal the presence of *Helicobacter pylori* (HP) in the Waldeyer's lymphatic tissue in the group of children and adults and its possible role in the etiology of benign diseases (chronic tonsillitis, OSAS, adenoids) and in the etiology of the tonsillar carcinoma.

In our study we have confirmed the hypothesis that HP is presented in the Waldeyer's lymphatic tissue as well as in the stomach and that the oropharynx and epipharynx are the an extragastric reservoir of HP. Mucosa associated lymphatic tissue in the stomach is similar to lymphatic tissue of Waldeyer ring. These conditions can be very favourable for the survival of HP and thus can promote inflammation changes and immune changes as well as in the stomach.

In our study, we have detected using real-time PCR method high incidence of HP DNA in adenoids and tonsillar tissue. In the group of benign diseases were the most frequent genotypes CagA-VacAs1bm1 and CagA-VacAs1bm2. In the group of the patients with tonsillar carcinoma was the most frequent genotype CagA-VacAs1bm1. Genotyping identified strains of HP showed differences in comparison with the predominant strains which are most frequently found in the stomach. Genotypic analysis of HP strains showed that prevailed less virulent strains of HP, so-called cagA negative and vacA positive. It is supposed, that the long colonization of less virulent strains in the oropharyngeal and epipharyngeal area leads to influence of immune mechanisms and can start the process of cancerogenesis. The correlation between particular types of HP genotypes and chronic tonsillitis/tonsillar carcinoma was not proved.

The question of the eradication in the group of patients with PCR positivity and serology positivity was not confirmed in our study and it is the subject of the future studies. The serology does not have a high sensitivity for the detection of acute infection and it is not possible to detect in which location the infection was/is taking place. The HP antibodies can persistent in the organism for a long time.

Our results contribute to the HP knowledge in children and adults.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, tonsills, adenoids, PCR, genotype

Doktorská disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a kombinovaného studia postgraduálního studia biomedicíny na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Klinice otorinolaryngologie 3.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie

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

Student: MUDr. Eva Nártová

Školitel: Prof. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

Datum zahájení studia: 29.9.2009

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli, Prof. MUDr. Jaromíru Astlovi, CSc. za vedení mého studia, pomoc při psaní odborných publikací a předání mnoha cenných rad nejen v rámci mého postgraduálního studia, ale rovněž cenných rad do života. Mé velké díky patří MUDr. Emilovi Pavlíkovi, CSc., za předání informací ohledně metodiky PCR, za jeho trpělivost při mých začátcích v laboratoři, za pomoc při zpracování vzorků a psaní odborných prací. Děkuji také paní Dagmar Váchalové, odborné laborantce Ústavu imunologie a mikrobiologie 1.LF UK, za pomoc při zpracování vzorků. Děkuji MUDr. Barboře Cerhové za pomoc při PCR diagnostice a za silné přátelské pouto, které mezi námi laboratorní prostředí vytvořilo. Děkuji spolupracovníkům z Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole, zejména Prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc. a Prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D za podporu během studia a děkuji rovněž bývalému přednostovi Kliniky otorinolaryngologie 3.LF UK, Doc. MUDr. Dr.med Alešovi Hahnovi, CSc. a současnému přednostovi Doc. MUDr. Martinovi Chovancovi, Ph.D za podporu a možnost dokončení mého postgraduálního studia. Děkuji své rodině za podporu a trpělivost během mého studia a psaní dizertační práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu MZ ČR: NT 11-523-6

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Literární úvod a přehled dané problematiky.....   | 10 |
| 1.1   | Mikrobiologická charakteristika a patogenetické působení <i>Helicobacter pylori</i> .....   | 10 |
| 1.2   | Diagnostika <i>Helicobacter pylori</i> .....  | 11 |
| 1.2.1 | Invazivní testy.....  | 11 |
| 1.2.2 | Neinvazivní testy.....  | 13 |
| 1.3   | <i>Helicobacter pylori</i> ve Waldeyerově lymfatickém okruhu a dutině ústní.....  | 15 |
| 1.4   | <i>Helicobacter pylori</i> v oblasti orofaryngeální a epifaryngeální lymfatické tkáně.....  | 15 |
| 1.5   | Podíl <i>Helicobacter pylori</i> na karcinogenezi.....  | 19 |
| 2     | Cíle a hypotézy dizertační práce.....   | 20 |
| 2.1   | Cíle dizertační práce.....  | 20 |
| 2.2   | Hypotézy dizertační práce.....  | 20 |
| 3     | Materiál a metody.....  | 21 |
| 3.1   | Sběr biologického materiálu.....  | 21 |
| 3.2   | Vyšetření vzorků.....   | 21 |
| 3.2.1 | Izolace nukleové kyseliny z tkáňových vzorků a její uskladnění.....   | 21 |
| 3.2.2 | Detekce nukleové kyseliny <i>Helicobacter pylori</i> a její genotypizace.....   | 21 |
| 3.2.3 | Ověření přítomnosti <i>Helicobacter pylori</i> – specifické DNA v tkáňových vzorcích.....   | 23 |
| 3.2.4 | Sérologická analýza sérových vzorků.....  | 23 |
| 4     | Výsledky práce.....   | 24 |
| 4.1   | Průkaz přítomnosti <i>Helicobacter pylori</i> ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu pomocí metody PCR a zhodnocení výskytu její DNA v této oblasti.....  | 24 |
| 4.2   | Popis genotypových rozdílů <i>Helicobacter pylori</i> a porovnání jednotlivých genotypů v tkáňových vzorcích patrových tonzil a adenoidních vegetací v rámci benigních a maligních onemocnění této oblasti..... | 27 |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2.1 | Benigní diagnózy.....   | 27 |
| 4.2.2 | Maligní diagnózy.....   | 29 |
| 4.3   | Porovnání zastoupení <i>cagA</i> genů a <i>vacA</i> genů ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu.....                            | 30 |
| 4.4   | Zhodnocení argumentu eradikace <i>Helicobacter pylori</i> v rámci výskytu <i>cagA</i> genu ve Waldeyerově lymfatickém okruhu..... | 31 |
| 5     | Diskuse.....  | 35 |
| 6     | Závěr.....  | 40 |
| 7     | Příloha.....  | 42 |
| 7.1   | Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem dizertační práce.....  | 42 |
| 7.1.1 | Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce.....  | 42 |
| 7.1.2 | Publikace bez IF.....   | 42 |
| 8     | Literatura.....   | 43 |
| 9     | Obsah přílohy.....  | 50 |

# 1 Literární úvod a přehled dané problematiky

## 1.1 Mikrobiologická charakteristika a patogenetické působení *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* (HP) je spirální, pohyblivá, mikroaerofilní bakterie. Její přítomnost je spjata zejména s lidskou populací, avšak některé studie dokazují její přítomnost i u zvířecích druhů (Terio et al., 2005). Infekce HP je považována za hlavní příčinu chronické gastritidy a hraje velmi důležitou roli v patogenezi vředové choroby, žaludečního lymfomu a karcinomu žaludku (Israel a Peek, 2001). Příčinná souvislost mezi působením HP a chronickou gastritidou se ukázala v roce 1983, kdy Marshall a Warren vykultivovali tuto bakterii z materiálu žaludeční sliznice.

Práci, postavenou na studii bioptických vzorků žaludeční sliznice u dětských pacientů s chronickou gastritidou, získaných sací metodou, provedla již v letech 1963 – 1966 Doc. MUDr. Miloše Sedláčková, CSc. v Praze. Její práce byla postavena na 224 případech dětí, na nichž popsala všechny charakteristiky gastritidy u dětí, etiologie zůstala však ve stavu hypotézy.

Výskyt infekce HP je odhadován mezi 40 – 80% a je spjat se zeměpisnou oblastí, věkem, rasou a socioekonomickým stavem dané země (Bureš et al., 2006). Zvýšený výskyt infekce HP je zaznamenán v rozvojových zemích. Ve státech střední a východní Evropy se prevalence udává mezi 60 – 95% (Bureš et al., 2006). Klinické projevy onemocnění se objevují pouze u 10 – 15% nakažených jedinců, což je pravděpodobně dáno rozdílnou imunitní odpovědí hostitele a odlišným stupněm virulence kmenů (Stromberg et al., 2003). Infekce může být získána již během dětství a probíhat latentně po celý život. Bakterie vyžaduje k růstu mikroaerofilní prostředí (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) a pro její kultivaci se používají půdy se sérem, koňskou krví a heminem (Bednář, 1996). Bakterie vyrůstá za 5 – 7 dní a vytváří okrouhlé kolonie 2 – 3 mm v průměru. Výrazným rysem je tvorba ureázy, katalázy a oxidázy. Ureáza pak štěpí ve tkáni přítomnou močovinu na NH<sub>3</sub> a CO<sub>2</sub> a amoniak pak neutralizuje volnou HCl v okolí bakterie v žaludku (Bednář, 1996). Přenosovou formou bakterie je forma kokoidní, která je více rezistentní k zevním vlivům. Cesty přenosu uvedeného patogenu nejsou doposud zcela objasněny, předpokládá se cesta oro – orální či oro – fekální (Brown, 2000).

Patologické působení HP je podmíněno interakcemi mezi hostitelem a mikrobem a je ovlivněno stupněm virulence jednotlivých kmenů (Stromberg et al., 2003). Progrese nemoci pak závisí na bakteriálním genotypu, vlivu prostředí, životním stylu i genetických predispozicích hostitele (Tegtmeier et al., 2011). HP se vyznačuje produkcí celé řady faktorů virulence. Nejdůležitější jsou dva sekreční proteiny: vakuolizační cytotoxin A (VacA) a cytotoxin – asociovaný gen A (CagA). CagA je produkován asi 60% kmenů HP a je kódován genem *cagA*, který se nachází v tzv. ostrůvku patogenity – PAI (Olivares a Gisbert, 2006). Tento ostrůvek kóduje sekreční systém typu IV (T4SS), jehož

prostřednictvím se CagA protein dostává do hostitelské buňky (Höcker a Hohenberger, 2003). Kmeny s přítomností *cagA* jsou označovány jako CagA+. U pacientů s těmito kmeny byl zaznamenán vyšší výskyt peptických vředů, atrofických gastritid a karcinomu žaludku. T4SS je řízen řadou genů, mimo jiné *cagI*, *cagL*, *cagY* a *cagA*. Proteiny kódované těmito geny jsou integrovány prostřednictvím vazby s integrinem B1 do hostitelské buňky, kde dochází k jejich fosforylaci za účasti onkogenních tyrosinkináz. Tento proces pak vede k produkci cytokinů a růstových faktorů.

Dalším důležitým faktorem virulence je VacA protein. Ten interaguje s receptory hostitelské buňky, což má za následek modifikaci lysosomálních funkcí, buněčnou vakuolizaci, apoptózu a inhibici některých imunitních mechanismů (Backert a Selbach, 2008),(Hatakeyama, 2008). Nositeli *vacA* genu jsou všechny kmeny HP. VacA protein je však produkován jen zhruba u 50% kmenů. Je to dáno především tím, že jednotlivé kmeny vykazují rozdílnou strukturu *vacA* genu. Jsou známy alely s1 a s2 signální sekvence *vacA* a m1 a m2 střední sekvence *vacA*. Za vysoce toxické jsou považovány kmeny genotypu s1m1, které jsou spojovány s vysokým výskytem intestinálních metaplasií a gastritid (Höcker a Hohenberger, 2003). K dalším faktorům virulence patří lipopolysacharidy, adhezíny (*babA1*, *babA2*) a enzym ureáza kódovaný ureázovým genem C.

Po proniknutí HP do lamina propria sliznice hrají hlavní roli v imunitní odpovědi hostitele dendritické buňky a monocyty. Tyto mají na svém povrchu receptory TLRs (Toll-like receptors) (Portal-Celhay a Perez-Perez, 2006). Vazbou receptorů na dané buňky dochází k aktivaci NK buněk (natural killers) a Th1 imunitní odpovědi, což je dominantní imunitní reakce v patogenezi HP. Indukuje expresi IFN – gamma. Po kontaktu s bakterií dochází k vyplavování prozánětlivých cytokinů TNF – alfa, IL-1beta, IL-8,12,18 (Portal-Celhay a Perez-Perez, 2006).

V souvislosti s poškozením žaludeční sliznice, zvýšenou proliferací a nádorovou transformací žaludečního epitelu byly popsány také změny v expresi EGF, EGFR (Schiemann et al., 2002), TGF – beta (Stromberg et al., 2003) a iNOS (Sakaguchi et al., 1999). Rovněž bylo zjištěno, že zvýšenou stimulaci makrofágů k produkci iNOS a NO způsobuje HP produkováná ureáza (Gobert et al., 2002)

## 1.2 Diagnostika *Helicobacter pylori*

Běžně používané detekční metody k průkazu infekce HP lze rozdělit na metody invazivní a neinvazivní. Při detekci infekce v oblasti orofaryngu se zpravidla užívají testy invazivní.

### 1.2.1 Invazivní testy

**Kultivační průkaz** – jedná se o metodu se 100% specificitou, sensitivita velmi závisí na řadě různých faktorů a na zkušenostech dané laboratoře (Velapatino et al., 2006). Kultivačně byl HP detekován řadou autorů (Bitar et al., 2006), (Pitkäranta et al., 2005). Kultivačním průkazem HP v

dutině ústní se jako první zabýval Krajden (Krajden et al., 1989). Jednou z podmínek úspěšné kultivace je dostatečně dlouhá doba bez užívání antibiotické terapie. Samotná kultivace pak probíhá na agarových půdách s přidáním obohacovadly, vhodnými pro růst této bakterie (Columbia agar, Wilkins Chalgren agar atd.) (Mégraud, 2007). Kultivace vyžaduje mikroaerofilní prostředí. Kolonie se pak hodnotí po 3 – 4 dnech a mají většinou charakter drobných okrouhlých kolonií, 2 – 3 mm v průměru. Uvedená metoda je velmi časově náročná a při detekci v orofaryngu může přinášet falešně negativní výsledky, neboť v orofaryngu se vyskytují i jiné bakteriální kmeny, které mohou růst HP inhibovat (Ishihara et al., 1997). Dalším problémem této metody je předpoklad, že HP přežívá v oblasti orofaryngu v tzv. kokoidních formách, které jsou velmi špatně kultivovatelné (Bode et al., 1993). Kultivační průkaz v orofaryngu je tedy značně limitován.

**Histopatologický průkaz HP** se v současné době příliš neužívá. Jedná se však o metodu, která může jako jediná detekovat léze související s HP infekcí (atrofie a buněčná metaplasie). Vzorky k histopatologickému průkazu jsou fixovány v 10% formaldehydu. Tkáň je barvena nejčastěji metodou hematoxylin – eosin, Giemsa, Warthin Starry či Genta (Rotimi et al., 2000). V rámci histopatologického průkazu se rovněž využívá imunohistochemická detekce či elektronová mikroskopie. Imunohistochemický průkaz je pak schopný zachytit i kokoidní formy HP. Elektronová mikroskopie je časově velmi náročná a není doposud součástí rutinních diagnostických postupů. Hodnocení histologických řezů závisí především na správně odebraném vzorku tkáně a na zkušenostech dané laboratoře rozpoznat morfologické rysy daného mikroba (Mégraud, 2007) Histopatologickým průkazem HP v orofaryngeální tkáni se zabývala řada studií (Bitar et al., 2005),(Jabbari Moghaddam et al., 2009). Na rozdíl od vzorků žaludeční sliznice jsou metody histopatologické detekce v orofaryngu limitovány přítomností velkého množství konkurenčních bakteriálních kmenů (Dowsett a Kowolik, 2003).

**Detekce ureázy** patří mezi rychlé, levné a jednoduché testovací metody, které byly užity v řadě studií (Khademi et al., 2007),(Unver et al., 2001). Tyto testy jsou založeny na průkazu ureázové aktivity HP (Qureshi et al., 1992) která spočívá v hydrolýze urey na oxid uhličitý a amonný iont. Koncentrace amonného iontu pak určuje pH, a tím vyvolává změnu barevného indikátoru (Vaira et al., 2000). Mezi nejvíce užívané ureázové testy patří CLO test (Campylobacter - like- organism) a RUT test (Rapid Urease Test). Některé práce ukazují významnou souvislost mezi pozitivitou RUT a histologickým průkazem HP (Madani et al., 2000) V orofaryngu je užití těchto metod značně omezeno, neboť v dutině ústní existují i jiné bakterie produkující ureázu – např. Streptococcus spp., Haemophilus spp., Actinomyces spp. atd. Zvyšuje se tak pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků (Dowsett a Kowolik, 2003).

**Molekulárně diagnostické postupy v detekci HP** v oblasti orofaryngu a epifaryngu zahrnují v současné době především metodu PCR (polymerázová řetězová reakce). Tato technika byla koncipována v roce 1983 Kary Mullisem v rámci řešení exponenciální amplifikace oligonukleotidů v beta – globinovém genu. Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky: denaturace, hybridizace a polymerace. Denaturace probíhá při teplotě 95°C a spočívá v rozpadu vodíkových můstků spojujících vlákna DNA. Vzniká tak jednořetězcová DNA, neboli templát. Hybridizace (annealing) se uskutečňuje při teplotě 50 – 60°C, spočívá v dosednutí primerů a rovněž vede k obnově dimerů DNA. Elongace je fází, kdy dochází polymerací k syntéze nového řetězce DNA komplementárního s templátem. Pro PCR se používají termostabilní DNA polymerázy, především Taq polymeráza. Průkaz HP infekce v orofaryngu pomocí metody PCR je popsán v řadě prací (Abdel-Monem et al., 2011), (Bitar et al., 2005), (Bitar et al., 2006), (Cirak et al., 2003). Pro detekci HP je často používána detekce ureC genu pomocí 16S rRNA primeru. Identifikace tohoto genu však nevyovídá nic o virulenci mikroba. Ve většině publikovaných prací byly proto nejčastěji detekovány geny *cagA* a další geny ostrůvku patogenity, zejména *vacA* (a jeho polymorfismy). Pomocí PCR lze také detekovat geny kódující adhezní proteiny – Bab A2, Sab A, či další geny důležité pro patogenitu – *oipA*, *dupA*, *iceA* (Mégraud, 2007). Všechny tyto geny určují virulenci HP. Nejčastěji využívanými systémy jsou klasická end-point PCR a PCR v reálném čase (real – time – PCR). Real-time PCR je založena na měření množství produktu v průběhu amplifikace a v multiplexní aplikaci umožňuje provádět genotypizaci jednotlivých kmenů HP pomocí různě značených hybridizačních sond. End point PCR je klasickou PCR metodou a užívá se zejména k detekci *cagA* a *vacA* genů. V posledních letech byla publikována řada prací zabývajících se detekcí HP v žaludku prostřednictvím PCR metody. Byl například detekován glmM gen pomocí Novel-primeru (Espinoza et al., 2011). Rovněž byla provedena detekce babA2 a iceA genů u pacientů s benigní žaludeční diagnózou (Montealegre O et al., 2010). Senzitivita PCR metody je především závislá na typu transportního média a rovněž na způsobu uchování vzorku do doby izolace nukleové kyseliny.

### 1.2.2 Neinvazivní testy

**Ureázový dechový test** je v současné době považován za zlatý standart metod k detekci infekce HP v žaludku (Kocna, 2006). Vzorky jsou analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie nebo metodou NDIRS (nondispersive infrared spektrometry). Tato metoda je založená na změnách oscilačního spektra molekul izotopů CO<sub>2</sub> v infračerveném světle. Použití této metody spočívá v

měření absolutních koncentrací plynu a naměřené hodnoty více kolísají. Důležité je kritérium změny poměru vydechovaného CO<sub>2</sub> v čase 30 oproti T<sub>0</sub> –DOB větší než 5 promile (Kocna, 2006). Dechový test byl použit i v modifikovaném provedení jako endoskopický UBT, vykazující přesnost v detekci. Dle Maastrichtského konsenzu z roku 2000 se jedná o vyšetření vhodné k průkazu infekce HP a rovněž je pokládáno za vyšetření určené ke kontrole eradikace. Největším problémem dechových testů je kvantitativní interpretace. Objem vzduchu při dýchání se liší v závislosti na fyzické aktivitě, psychickém stavu a dalších faktorech. Výsledkem je pak jejich vysoká biologická aktivita.

**Detekce HP antigenů ve stolici (Stool Antigen Test)** většinou se jedná o sadu komerčně vyráběných testů založených na imunochromatografických či imunoenzymových metodách (Dzierżanowska-Fangrat et al., 2006). U dětí je pak považován za ekvivalent dechového testu (Doorn, 2001). Principem testu je vazba antigenů HP na polyklonální králičí anti-HP protilátku a stanovení probíhá in vitro metodou ELISA. Výsledná reakce se hodnotí vizuálně na základě změny barvy či fotometricky při 450 nm.

**Sérologická detekce protilátek proti HP** stojí na hranici mezi invazivními a neinvazivními metodami. Běžně jsou stanovovány protilátky IgG, IgA, IgM. Rovněž lze ze séra detekovat přítomnost protilátek proti CagA. K detekci protilátek se rutinně využívá metoda ELISA, která má sensitivitu 92% a specifitu 96% (Mégraud, 1995).

### 1.3 *Helicobacter pylori* ve Waldeyerově lymfatickém okruhu a dutině ústní

Waldeyerův lymfatický okruh je definován jako místa enormního nakupení lymfatické tkáně lamina propria mucosae hltanové úžiny (isthmus faucium). Waldeyerův okruh zahrnuje: patrové mandle (tonsillae palatinae), jazykovou mandli (tonsilla lingualis), nosohltanovou mandli (tonsilla pharyngea) a tonsillae tubariae. V rámci orálně - orálního či fekálně – orálního přenosu HP infekce lze očekávat přítomnost HP rovněž v dutině ústní a v orofaryngu. Do nedávna byl za jediný rezervoár infekce HP v lidském organismu považován žaludek. V posledních letech je diskutována otázka kolonizace orofaryngeální a epifaryngeální lymfatické tkáně tímto mikrobem a jejich možná funkce jako extragastrického zdroje infekce HP. Předpokládaný výskyt HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu je založen na podobnosti žaludeční a orofaryngeální/epifaryngeální lymfatické tkáně. Možný příčinný vztah HP a extra-gastrointestinálních chorob je zkoumán od roku 1993 (Konturek et al., 1999). Byla publikována řada prací, zabývajících se výskytem HP v dutině ústní a v orofaryngu/epifaryngu. Předpokládá se, že by HP v lymfatické orofaryngeální tkáni Waldeyerova okruhu mohl aktivovat imunitní systém (např. aktivací dendritických buněk) a zasahovat do exprese různých cytokinů a tím podporovat vznik chronického zánětu a eventuálně působit jako přímý karcinogen této oblasti. Oblast nosohltanu a patrových tonzil může být přímo exponována působením HP u nemocných s refluxní chorobou jícnu, zahrnující onemocnění vznikající na podkladě gastroezofageálního a extraezofageálního refluxu, který je častý především u dětí. Problematikou vztahu refluxního onemocnění a výskytu HP v oblasti orofaryngeální a epifaryngeální lymfatické tkáně se ve své práci podrobně zabýval Kutra (Kutra et al., 2014). Práce Pavlíka z roku 2007 podporuje možnost orofaryngu jako extragastrického zdroje HP nálezem odlišných kmenů HP v žaludku a v orofaryngu (Pavlík et al., 2007)

Bakterie byla detekována v dentálním plaku a ve slinách (Karczewska et al., 2002), (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2005). Dentální plak a sliny jsou tedy považovány za extragastrický zdroj infekce HP. Shrnutím literatury o existenci HP v dutině ústní se pak zabýval v roce 2014 Al Sayed (Al Sayed et al., 2014).

### 1.4 *Helicobacter pylori* v oblasti orofaryngeální a epifaryngeální lymfatické tkáně

Význam tonzilární tkáně pro kolonizaci HP poprvé ve své práci zdůraznil Minocha (Minocha et al., 1997). V roce 2003 Círak prokázal v tonzilární tkáni CagA pozitivní kmeny HP metodou PCR s použitím 16S ribozomálního primeru (Círak et al., 2003). Stejný poznatek učinil o tři roky později Bulut (Bulut et al., 2006). Yilmaz M. a spol. detekovali pomocí 23S ribozomálního primeru HP v adenoidní tkáni (Yilmaz et al., 2004), Yilmaz T. a spol. pak detekovali v roce 2006 HP v tonzilární i adenoidní tkáni prostřednictvím ribozomálního primeru (Yilmaz et al., 2006). Khademi prokázal

přítomnost HP v tonsilární tkáni metodou CLO testu (Khademi et al., 2005). Tato metoda byla užita rovněž v roce 2001 k úspěšné detekci HP v adenoidní tkáni (Unver et al., 2001).

Ve studii Bitara a spol. byl zjištěn HP v adenoidní tkáni metodou RUT (rapid urease test) a histologickým průkazem (Bitar et al., 2005, 2006). Rovněž byl srovnáván výskyt HP na povrchu a uvnitř tonzil (Khademi et al., 2007). Práce Jelavice a spol. dokládá, že tonsilární tkáň není důležitým rezervoárem infekce HP u dětí podstupivších tonzilektomii (Jelavic et al., 2007). Vayisoglu a spol. v roce 2008 zjistili pozitivitu HP ve dvou adenoidních vegetacích z celkového počtu 91 dětských pacientů pomocí RUT a ve dvou případech byl pozitivní rovněž imunohistochemický průkaz. Ve své práci zpochybňuje funkci tonsilární tkáně jako extragastrického zdroje infekce HP a rovněž vyvrací možnou souvislost chronické tonzilitidy s infekcí HP (Vayisoglu et al., 2008). Eyigor a spol. se v roce 2009 pokoušeli detekovat *glm* gen v tonsilární tkáni pomocí GJB2 primeru metodou PCR. V žádném vzorku tkáně tento gen nalezen nebyl, což vedlo k závěru, že tonsilární tkáň není extragastrickým zdrojem infekce HP (Eyigor et al., 2009). Jabbari Moghaddam a spol. ve své práci dokládají výskyt HP infekce v tonsilární tkáni pomocí metody RUT, kterou staví do pozice málo senzitivní metody pro detekci této infekce (Jabbari Moghaddam et al., 2009). V roce 2010 se zabývali detekcí HP infekce v tonsilární tkáni Vilarinho a spol. Pomocí RUT a imunohistochemického průkazu detekovali daný patogen v tonsilární tkáni pěti dětských pacientů. Metody PCR a FISH (Fluorescence in situ hybridization) v dané práci pozitivní výsledky nepřinesly, což dle autorů rovněž vyvrací teorii tonsilární tkáně jakožto extragastrického zdroje infekce HP (Vilarinho et al., 2010). Souvislostí kokoidních forem HP v tonsilární tkáni a IgA nefropatií se ve své práci zabývali Kussano a spol. Výstupy této práce ukazují na možnou souvislost onemocnění ledvin ve výskytu kokoidních forem HP (Kusano et al., 2010). V roce 2011 se studiem přítomnosti HP v tonsilární tkáni zabývaly dvě práce: Toros a spol. pomocí metody RUT a histologického průkazu přítomnost HP v tonsilární tkáni neprokázali (Toros et al., 2011), Abdel Monem a spol. pak publikovali prospektivní studii, ve které zachytili pozitivitu HP v tonsilární tkáni metodou RUT a rovněž metodou PCR, pomocí níž detekovali *ureC* gen (Abdel-Monem et al., 2011). V roce 2012 analyzoval Farivar et al. celkem 103 vzorků tonsilární tkáně pomocí metody Real-time PCR se sondami Scorpion s 21,53% pozitivních výsledků (Farivar et al., 2012). Vysokou pozitivitu HP ve vzorcích adenoidní tkáně prokázal v roce 2014 Kraus (Kraus et al., 2014). V roce 2015 detekoval Bayindir a spol. V celkem 57 vzorcích adenoidní a tonsilární tkáně *cagA* gen a gen pro fosfoglukosaminmutasu), úspěšnost metody PCR byla 10,9%, protilátky proti HP pak byly detekovány v 89% (Bayindir et al., 2015). V roce 2016 se zabýval detekcí HP v adenoidní tkáni Cedeno (Cedeño et al., 2016). Incidencí HP kolonizace se ve své práci zabýval také Güclü v roce 2013, který prokázal nízkou incidenci kolonizace HP v adenoidní tkáni a tonsilární tkáni, resp. Ze 49 tonsilárních vzorků bylo PCR pozitivních 6,1% (3 vzorky), RUT pozitivních 2 (4,1%), z 52 vzorků adenoidní tkáně byly 3 vzorky (5,8%) PCR pozitivní (Guclu et al.,



2013) . Kaymakci potvrdil pozitivitu HP v adenoidní tkáni pomocí PCR u 2 pacientů z 23 (Kaymakçi, 2014) .Kolonizaci adenoidní tkáně HP připustil na základě svých výsledků i Aydin v roce 2014. kdy detekoval 2 pozitivní vzorky pomocí PCR metody (Aydin et al., 2014). Narozdíl od něho Aliakbari v roce 2011 detekoval 0 HP pozitivních vzorků v adenotonsilární tkáni pomocí metody PCR (Aliakbari et al., 2011)

Následující tabulka (Tab.1) ukazuje přehledně práce, ve kterých se autoři zabývali detekcí HP ve tkáních Waldeyerova lymfatického okruhu za použití různých detekčních metod .

| <b>Autor</b>     | <b>Rok</b> | <b>Počet případů</b> | <b>Typ odebrané tkáně</b>   | <b>Diagnostická metoda</b>            | <b>Počet pozitivních případů na H. pylori</b>   |
|------------------|------------|----------------------|---|---------------------------------------|---|
| Di Bonaventura   | 2000       | 36                   | tonzilární stěr   | kultivace, imunohistochemický průkaz  | 0 (0 %)   |
| Di Bonaventura   | 2001       | 75                   | tonzilární stěr a biopsie   | PCR                                   | 0 (0 %)   |
| Unver et al.     | 2001       | 19                   | adenoidní tkáň  | CLO test                              | 11 (58 %)   |
| Skinner et al.   | 2001       | 50                   | tonzilární tkáň   | CLO test, imunohistochemický průkaz   | 0 (0 %) CLO test a imunocytochemie  |
| Uygur-Bayramicli | 2002       | 27                   | tonzilární tkáň   | histologie, imunohistochemický průkaz | 0 (0 %) histologie, imunohistochemický průkaz   |
| Cirak            | 2003       | 23                   | tonzilární a adenoidní tkáň   | PCR (16S ribosomální RNA, CagA)       | 7 (30 %) pozitivních na H. pylori, 5 z nich (71 %) pozitivních na CagA gen  |
| Yilmaz et. al.   | 2004       | 50                   | tonzilární a adenoidní tkáň   | CLO test                              | 0 (0 %)   |
| Yilmaz et. al.   | 2005       | 38                   | adenoidní tkáň, středoušní tekutina                                   | PCR (23S ribosomální RNA)             | 12 (67 %) ve středoušní tekutině, 1 (5 %) v adenoidní tkáni   |
| Pitkaranta       | 2005       | 20                   | adenoidní tkáň, středoušní tekutina                                   | Kultivace                             | 0 (0 %)   |
| Khademi et. al.  | 2005       | 56                   | tonzilární a adenoidní tkáň   | CLO test                              | 27 (48%)  |
| Bitar            | 2005       | 25                   | adenoidní tkáň  | RUT, histologie a nested PCR (UreA)   | 21 (84 %) pozitivních v RUT, 4 (16 %) pozitivních v histologii, 0 (0 %) pozitivních v nested PCR  |
| Bulut            | 2006       | 71                   | tonzilární a adenoidní tkáň   | PCR (CagA - glmM gen)                 | 29 (24,6 %) pozitivních na H. pylori, 17 z nich (58,6 %) CagA pozitivních   |
| Bitar            | 2006       | 28                   | adenoidní tkáň, středoušní tekutina                                   | kultivace, RUT, PCR (ureC-gen)        | 0 (0 %) ve středoušní tekutině, 10 (77 %) v adenoidní tkáni podle RUT, 0 (0 %) podle PCR  |
| Yilmaz et. al.   | 2006       | 22                   | adenoidní a tonzilární tkáň, středoušní tekutina, sliznice promotoria | kultivace, PCR (16S RNA)              | středoušní tekutina: 2 pozitivní v kultivaci, 7 v PCR; sliznice promotoria: 1 v kultivaci, 7 v PCR; adenoidní tkáň: 11 (50 %) v kultivaci, 14 (64 %) v PCR; tonsilární tkáň: 12 (55 %) v kultivaci, 14 (64 %) v PCR |

|                   |      |     |                                     |   |  |
|-------------------|------|-----|-------------------------------------|---|--|
| Jelarie et al.    | 2007 | 139 | tonzilární a adenoidní tkáň         | kultivace, RUT  | 17 (12 %) pozitivních v RUT, 0 (0 %) pozitivních v kultivaci   |
| Kusano et. al.    | 2007 | 173 | patrové tonzily                     | imunohistochemický průkaz, elektronová mikroskopie, hybridizace in-situ (16S RNA gen) | 126 (72,9 %) pozitivních   |
| Vayisoglu et. al. | 2008 | 91  | tonzilární a adenoidní tkáň         | RUT, imunohistochemický průkaz  | 2 (2,2 %) v adenoidní tkáni, 0 (0 %) v tonsilární tkáni s RUT, 0 (0 %) v imunohistochemickém průkazu               |
| Eyigor et. al.    | 2009 | 55  | 35 adenoidních tkání, 20 tonzil     | RUT, PCR (glmM gen)   | RUT 5,5 % pozitivních, 0 % PCR pozitivních   |
| Ozcan             | 2009 | 25  | adenoidní tkáň, středoušní tekutina | CLO, imunohistochemický průkaz  | 0 (0 %) CLO pozitivních, 0 (0 %) imunohistochemicky pozitivních  |
| Jabbari Moghaddam | 2009 | 285 | tonzilární tkáň                     | RUT, histopatologie   | 113 (39,6 %) pozitivních s histopatologií, 40 (14 %) pozitivních s RUT   |
| Vilarinho et. al. | 2010 | 62  | adenoidní a tonzilární tkáň         | RUT, imunohistochemický průkaz, FISH, PCR-DNA (vacA gen)                              | 3 pozitivní s RUT, 2 pozitivní s imunohistochemickým průkazem, 0 pozitivních s FISH, 0 pozitivních s PCR           |
| Toros et. al.     | 2011 | 84  | tonzilární a adenoidní tkáň         | RUT, histopatologie   | 0 (0 %) pozitivních s RUT, 0 (0 %) pozitivních s histopatologií  |
| Abdel-Monem       | 2011 | 20  | adenoidní a tonzilární tkáň         | RUT, PCR (ureC-gen)   | 16 (53,3 %) pozitivních s RUT, 5 (16,6 %) pozitivních s PCR  |
| Hussey et al.     | 2011 | 93  | adenoidní tkáň                      | Nested RT-PCR (RNA)   | 1 positive ( Wolinella africanus)  |
| Farivar et al.    | 2012 | 103 | tonzilární tkáň                     | Scorpion RT - PCR   | 21,35% positive  |
| Kraus et al.      | 2014 | 49  | adenoidní a tonzilární tkáň         | RT-PCR  | 98% positive, 2% negat.  |
| Bayindir et al.   | 2015 | 57  | adenoidní a tonzilární tkáň         | HP protilátky, PCR (cagA, fosfoglukosaminmutasa)                                      | protilátky 89%, PCR 10,9%  |
| Kaymaki           | 2014 | 23  | adenoidní tkáň                      | PCR   | 8,7% pozitivních   |
| Nártová           | 2014 | 89  | tonzilární tkáň                     | PCR   | 80%PCR pozitivita u chronických tonsilitid, z toho cagA gen u 25%. Ve skupině SAS 82,76% pozitivitám cagA u 20,83% |
| Lukeš             | 2014 |     | tonzilární tkáň                     | PCR   | 73,91% pozitivita ve skupině tonzilárních tumorů, 70,0% u chronických tonsilitid, 69,23% OSAS vzorků               |
| Katra             | 2014 | 30  | adenoidní tkáň                      | PCR   | 90% pozitivita, cagA gen 33,33%  |

*Tabulka 1: Přehled relevantních vědeckých prací, zabývajících se detekcí Helicobacter pylori v lymfatické tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu*

## 1.5 Podíl *Helicobacter pylori* na karcinogenezi

*Helicobacter pylori* je řazen mezi karcinogeny I. typu dle IARC (Logan, 1994). Existují tři základní možné cesty karcinogeneze (Lukeš et al., 2008a).

1. působení HP jako přímého mutagenu (Hatakeyama, 2006)
2. imunitní inhibice T- buněk prostřednictvím vakuolizačního cytotoxinu (Boncristiano et al., 2003).
3. Karcinogenní působení HP zvýšením hladin řady cytokinů a regulačních molekul, zejména pak vzestup hladin TGF, EGF a NOS, kdy existuje předpoklad, že zvýšená exprese těchto molekul se podílí na orofaryngeální karcinogenezi (Lukeš et al., 2008a)

Práce Lukeše et al. z roku 2007 pak ukazuje na základě imunohistochemického průkazu zvýšené hladiny eNOS, iNOS a kaspázy-3 u chronických zánětů tonzil a u tonzilárních karcinomů (Lukeš et al., 2008b). Práce Pavlíka et al. z roku 2015 podporuje teorii dlouhodobé kolonizace HP v oblasti tonzil a orofaryngu celkově, rovněž tak připouští možnost ovlivnění HP imunitního systému a následný zlom v proces kancerogeneze (Pavlik et al., 2015).

Byl zkoumán především vztah mezi laryngeálními, popř. laryngopharyngeálními spinocelulárními tumory a HP. Existuje tak řada prací, které tuto teorii buď podporují, či vyvrací. Metaanalýza Zhuo et al. z roku 2008 připouští infekci HP jako potenciální rizikový faktor laryngeálního karcinomu (Zhuo et al., 2008). Rovněž Gong et al. svou prací v roce 2010 tuto teorii podporuje (Gong et al., 2010). Dayama et al. se zabýval ve své studii z Indie výskytem laryngeálních karcinomů a možnou souvislostí jejich vzniku s pozitivitou HP. Přiklání se tak ke vztahu HP a rakoviny v orální oblasti (Dayama et al., 2011). Pozitivní vztah HP a laryngopharyngeálních spinocelulárních tumorů potvrzuje i práce Guilemany et al. z roku 2014 (Guilemany et al., 2014). Naopak práce Amizadeh et al. z roku 2015 se k roli HP jako možného patogenu při vzniku spinocelulárních karcinomů laryngu nepřiklání (Amizadeh et al., 2015). Stejně tak práce Zhona et al. z roku 2016 (Zhou et al., 2016)

## 2 Cíle a hypotézy dizertační práce

Dizertační práce je zaměřena na studium kolonizace tkáně Waldeyerova lymfatického okruhu *Helicobacter pylori*. Zabývá se detekcí této bakterie v dané oblasti a následnou genotypizací. Zabývá se otázkou, zda HP může být etiologickým faktorem při vzniku benigních a maligních onemocnění v této oblasti.

### 2.1 Cíle dizertační práce

1. Průkaz přítomnosti *Helicobacter pylori* ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu pomocí metody real-time PCR a zhodnocení výskytu její DNA v této oblasti.
2. Popis genotypových rozdílů *Helicobacter pylori* a porovnání jednotlivých genotypů v tkáňových vzorcích patrových tonzil a adenoidních vegetací v rámci benigních a maligních onemocnění této oblasti.
3. Porovnání zastoupení *cagA* genů a *vacA* genů v dané oblasti.
4. Zhodnocení argumentu indikace eradikace *Helicobacter pylori* v rámci výskytu *cagA* genu ve Waldeyerově lymfatickém okruhu.

### 2.2 Hypotézy dizertační práce

**Hypotéza 1:** Ve Waldeyerově lymfatickém okruhu se vyskytuje infekce *Helicobacter pylori* stejně tak jako v žaludku.

**Hypotéza 2:** Nález kmenů *Helicobacter pylori* v oblasti Waldeyerova lymfatického okruhu a současný sérologický průkaz infekce je argumentem k provedení eradikace u daných pacientů.

**Hypotéza 3:** Existuje korelace mezi výskytem konkrétních genotypů a chronickým zánětem nebo maligním onemocněním ve Waldeyerově lymfatickém okruhu.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Sběr biologického materiálu

Všechny vzorky byly odebírány s řádným informovaným souhlasem pacientů na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole v letech 2009 – 2014 a dále pak na ORL oddělení nemocnice Rudolfa a Stefanie Benešov. Pacienti byli operováni pro chronickou tonzilitidu, pro hypertrofii tonzil při syndromu obstrukční spánkové apnoe, pro zvětšenou adenoidní vegetaci a pro orofaryngeální tumory. Z výzkumu byly vyřazeni pacienti, kteří v minulosti podstoupili eradikaci HP. Ve skupině dospělých pacientů bylo 145 vzorků tonzilární tkáně, resp. 80 vzorků tonzil s diagnózou chronické tonzilitidy (55,71%), 42 vzorků tonzil s diagnózou OSAS (28,97%) a 23 vzorků tonzil s diagnózou tonzilárního karcinomu (15,86%). Celkem bylo odebráno 79 dětských tkáňových vzorků, 62 z adenoidních vegetací (78,48%), 17 pak z tonzilární tkáně při OSAS (21,52%). U 12 dětských pacientů byla odebrána tkáň adenoidní i tonzilární. U skupiny pacientů s OSAS byla předpokládána přítomnost zdravé tonzilární tkáně. V úvodu chirurgického výkonu po zavedení endotracheální intubace byly odebrány tkáňové vzorky tonzilárních karcinomů a tonzil za sterilních podmínek, před aplikací anestetik a dezinfekčních prostředků do dutiny ústní. Vzorky byly následně vloženy do transportního media (Microtest<sup>R</sup> M4RT, Remel Inc., USA) pro PCR zpracování a transportovány do laboratoře.

### 3.2 Vyšetření vzorků

#### 3.2.1 Izolace nukleové kyseliny z tkáňových vzorků a její uskladnění

DNA *Helicobacter pylori* z tkáňových vzorků byla izolována s využitím MagNA Pure Compact Systému (Tegimenta AG, Rotkreuz, Switzerland) a soupravou MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics), s užitím protokolu Total\_NA 400\_100 a s předmytím v MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche Diagnostics). Izolované vzorky DNA *Helicobacter pylori* byly uskladněny při teplotě -80 °C.

#### 3.2.2 Detekce nukleové kyseliny *Helicobacter pylori* a její genotypizace

Genetická analýza byla pro tuto práci založena na užití primerů a hybridizačních sond podle van Doorna (van Doorn et al., 1998). Pro *cagA* gen, střední region *vacA* genu a pro signální úsek *vacA* genu byly vyvinuty ve spolupráci s TIB – Molbiol GmbH v Berlíně tři real – time PCR assaye. Byly použity následující primery: *cagA* F (+), *cagA* R (-), HPMGF (+), HPMGR- (-), VAF1F(+) a VAXR (-) dle Van Doorna a spol. (van Doorn et al., 1998). Hybridizační sondy TaqMan byly vytvořeny pro detekci specifických sekvencí *cagA*, *vacA* m1 a *vacA* m2. Pro *cagA* esej byly vytvořeny FAM-BBQ

značené sondy (detekce 530nm), pro střední sekvenci vacA FAM-BBQ značené TM sondy pro M1 (530nm) a HEX-BBQ značené TM sondy pro M2 (560nm). TaqMan<sup>R</sup> real-time PCR eseje byly prováděny na zařízení LightCycler<sup>R</sup>, verze 2.0 s šestikanálovou detekcí: 530,570,610,640,670 a 705nm. Byl použit komerčně vyráběný LightCycler<sup>R</sup> TaqMan<sup>R</sup> MasterMix (Roche Applied Science, Basel.), Schwietzerland) – 15ul MasterMixu včetně primerů a sond a 5ul vzorku izolátu DNA na 20ul kapiláru.

Pro real-time PCR esej k detekci signální sekvence vacA genu byly použity hybridizační sondy S1aLC(LC610), S1bLC(LC640) a S2 LC (LC705) společně s komerčním LightCycler<sup>R</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) – 15ul MasterMixu včetně primerů a sond a 5 ul vzorku izolátu DNA na 20ul kapiláru.

Amplifikace o 45 cyklech využívala protikontaminačního systému AmpErase – počáteční denaturace při teplotě 95stC po dobu 10 minut sloužila rovněž k denuraci enzymu Uracil-N-glykosylázy. Následných 44 cyklů mělo amplifikační profil upravený dle pokynů výrobce primerů a sond. V každém cyklu probíhala detekce signálů v rámci multiplexních rtPCR fluorescenčních vlnových délek. Analýza dat byla provedena pomocí Roche LightCycler software version 3.5.3. Následující dvě tabulky ukazují přehled užitých primerů a sond metodou PCR. Přehled užitých sond a primerů ukazují souhrnně tabulky 2 a 3.

| Gen    | Typ    | Počet nukleotidů | Sekvence   | Detekce/nm |
|--------|--------|------------------|--|------------|
| cagA   | cag_TM | 28               | 6FAM-ATA ACG CTG TCG CTT CAT ACG ATC CTG A-BBQ   | 530        |
| vacA S | S1a_LC | 21               | LC Red610-GCR TTR GTC AGC ATC ACA CCG-PH         | 610        |
|        | S1b_LC | 21               | LC Red640-GCG TTG ATT AGY KCC ATA CCG-PH         | 640        |
|        | S2_LC  | 21               | LC Red705-GCT AAY ACG CCA AAY GAT CCC-PH         | 705        |
| vacA M | M1_TM  | 30               | 6FAM-ACC ACC ATT ACC CGT ATC AAT ACC TTT AAA-BBQ | 530        |
|        | M2_TM  | 26               | HEX-CTA GTG TTT AGC CCG TTA TCG CTC TT-BBQ       | 560        |

*Tabulka 2: Přehled užitých sond*

| Gen    | Primer | Počet nukleotidů | Sekvence                            |
|--------|--------|------------------|-------------------------------------|
| cagA   | cagA F | 24               | 5-TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG-3 |
|        | cagA R | 22               | 5-CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C-3   |
| VacA S | VA1F   | 21               | 5-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC-3     |
|        | VA1R   | 19               | 5-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C-3       |
| vacA M | HPMGF  | 21               | 5-CAG AGC CAC TTT CAA TAA CGA-3     |
|        | HPMGR  | 21               | 5-CGT CCA AAT AAT TCC AAG GG-3      |

Tabulka 3: Přehled užitých primerů

### 3.2.3 Ověření přítomnosti *Helicobacter pylori* – specifické DNA v tkáňových vzorcích

V červnu 2012 se na trhu objevila nová komerční real-time PCR esej pro detekci flagelárního genu (fla genu) *Helicobacter pylori* – Bioron Real – Line Fla Format (Bioron, Germany). Archivované vzorky patientských tkání byly rozmrazeny a následně testovány výše uvedeným komerčním testem pro srovnání a potvrzení přítomnosti HP – specifické DNA ve tkáňových vzorcích.

### 3.2.4 Sérologická analýza sérových vzorků

K potvrzení infekce *Helicobacter pylori* u pacientů byla použita sérologická detekce. Sérové vzorky byly testovány kvantitativním komerčním ELISA testem ( EIA H. pylori, Test-Line, Czech Republic) na IgG, IgA a IgM protilátky. Stanovení bylo vyjádřeno indexem pozitivity (IP= poměr průměrných absorbancí testovaného séra a cut off) a hodnoceno jako pozitivní pro  $IP > 1,2$ . detekci protilátek specifického anti-CagA proteinu byl použit komerční test *Helicobacter p120* (CagA) ELISA Test-Line. Testy byly provedeny na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1.LF UK a VFN.

## 4 Výsledky práce

V následujících kapitolách výsledků dizertační práce jsou přehledně shrnuty výsledky všech přiložených publikací.

### 4.1 Průkaz přítomnosti *Helicobacter pylori* ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu pomocí metody PCR a zhodnocení výskytu její DNA v této oblasti.

Soubor čtyř přiložených publikací se zabývá detekcí *Helicobacter pylori* ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu prostřednictvím metody real-time PCR. Práce se zabývají jak skupinou dospělých pacientů (Nártová et al., 2014; Lukeš et al., 2014) tak skupinou pacientů dětských (Kraus et al., 2014; Katra et al., 2014).

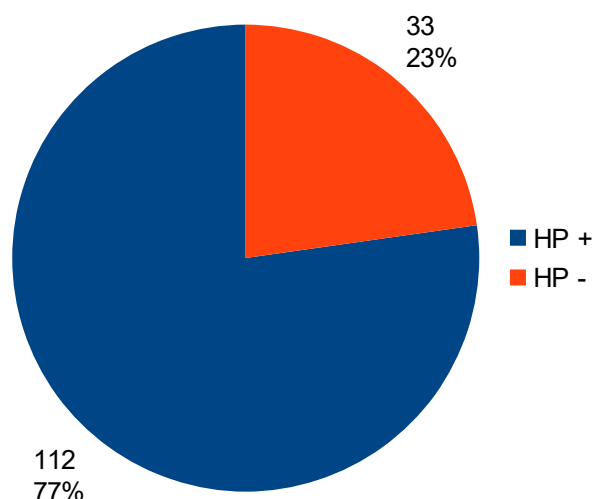
Do skupiny dospělých pacientů bylo celkem zařazeno 193 pacientů. Diagnózami v této skupině byly chronická tonzilitida, OSAS (syndrom obstrukční spánkové apnoe) a tonzilární spinocelulární karcinom. Celkem bylo užito k detekci *Helicobacter pylori* metodou real-time PCR 145 vzorků tonzilární tkáně, resp. 80 vzorků tonzil s diagnózou chronické tonzilitidy (55,71%), 42 vzorků tonsil s diagnózou OSAS (28,97%) a 23 vzorků tonzil s diagnózou karcinomu (15,86%). Přehled ukazuje tabulka 4.

| Počet vzorků | Diagnóza              | Procentuální zastoupení |
|--------------|-----------------------|-------------------------|
| 80           | Chronická tonzilitida | 55,17%                  |
| 42           | OSAS                  | 28,97%                  |
| 23           | Karcinom tonzily      | 15,86%                  |

Tabulka 4: Přehled procentuálního zastoupení diagnóz.

Přítomnost *Helicobacter pylori* byla z celkového počtu vzorků (n=145) prokázána pomocí metody real-time PCR u 112 pacientů (77,24% vzorků), u 33 pacientů (22,76% vzorků) přítomnost *Helicobacter pylori* v tonzilární tkáni prokázána nebyla. Následující graf ukazuje přehledně výskyt *Helicobacter pylori* v tonzilární tkáni u dospělých pacientů.





*Graf 1: Výskyt HP v tonzilární tkáni u dospělých pacientů*

Následující tabulka 5 pak počet HP pozitivitu/negativitu v rámci jednotlivých diagnóz.

| Typ diagnózy          | HP + | HP - |
|-----------------------|------|------|
| Chronická tonzilitida | 62   | 18   |
| OSAS                  | 33   | 9    |
| Karcinom tonzily      | 17   | 6    |

*Tabulka 5: Srovnání HP pozitivitu/negativitu v rámci jednotlivých diagnóz*

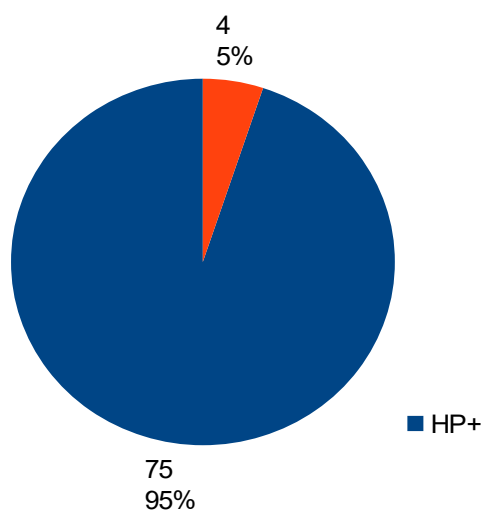
Bylo prokázáno, že DNA *Helicobacter pylori* byla v tonzilární tkáni u dospělých pacientů detekována, *Helicobacter* zde tedy přítomný je, stejně tak, jako v lidském žaludku, pro který je hlavním patogenem.

Do skupiny dětských pacientů (Kraus et al., 2014; Katra et al., 2014) bylo celkem zařazeno 67 dětí. Diagnózami v této skupině byly hypertrofická adenoidní vegetace a OSAS, byly tedy odebírány vzorky adenoidní tkáně a tonzilární tkáně. Celkem bylo odebráno 79 tkáňových vzorků, 62 z adenoidních vegetací (78,48%), 17 pak z tonzilární tkáně při OSAS (21,52%). U 12 dětských pacientů byla odebrána tkáň adenoidní i tonzilární. Přehled ukazuje tabulka 6.

| Počet vzorků | Diagnóza           | Procentuální zastoupení |
|--------------|--------------------|-------------------------|
| 62           | Adenoidní vegetace | 78,48%                  |
| 17           | OSAS               | 21,52%                  |

Tabulka 6: Počet tkáňových vzorků dětských diagnóz

Z celkového počtu 79 odebraných vzorků u dětských pacientů byla prokázána přítomnost *Helicobacter pylori* pomocí metody real-time PCR u 75 z nich (94,94%) a u 4 vzorků přítomnost bakterie prokázána nebyla (5,06%), jak znázorňuje graf 2.



Graf 2: HP pozitivita / negativita u vzorků dětských pacientů.

Ve skupině vzorků adenoidních vegetací byla pozitivní PCR detekce HP v 59 vzorcích tkáně (n=62), což představuje 95,16%. Ve vzorcích tonzilární tkáně při OSAS byla PCR HP detekce pozitivní v 16 případech, což představuje 94,12%. Přehled ukazuje tabulka 7.

| Typ diagnózy       | HP + | HP - |
|--------------------|------|------|
| Adenoidní vegetace | 59   | 3    |
| OSAS               | 16   | 1    |

Tabulka 7: HP pozitivita/HP negativita u vzorků dětských pacientů

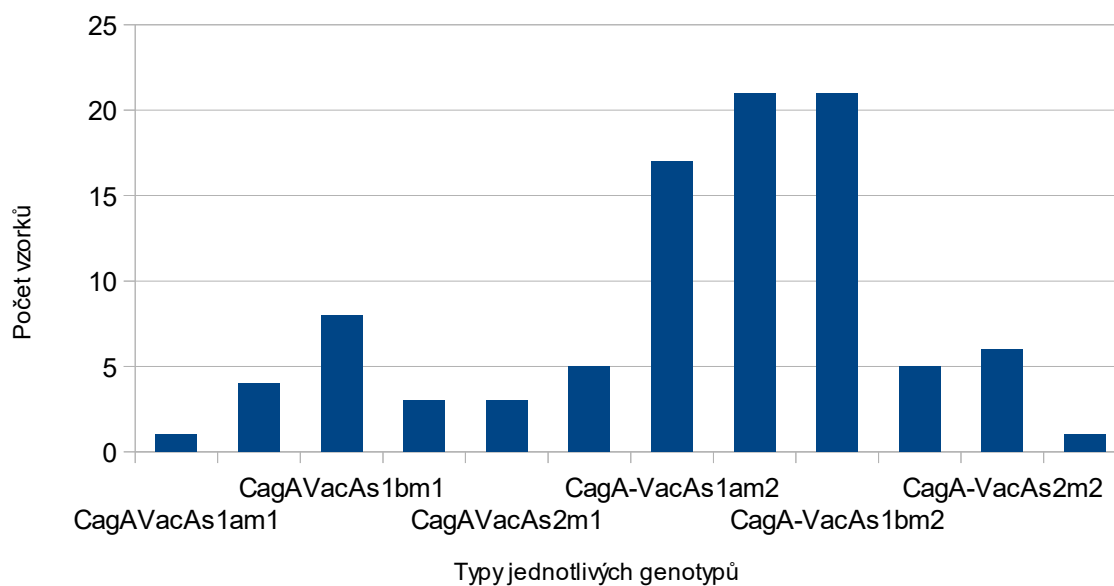
Tyto výsledky prokazují, že stejně tak jako u skupiny dospělých, tak i u skupiny dětských pacientů se ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu DNA *Helicobacter pylori* nachází.

## 4.2 Popis genotypových rozdílů *Helicobacter pylori* a porovnání jednotlivých genotypů v tkáňových vzorcích patrových tonzil a adenoidních vegetací v rámci benigních a maligních onemocnění této oblasti.

### 4.2.1 Benigní diagnózy

Ve skupině dospělých pacientů byly zkoumány typy benigních diagnóz: chronická tonsilitida a OSAS. Ve skupině dětských pacientů byly pak benigními diagnózami adenoidní vegetace a OSAS. Výskyt HP pozitivity/negativity u jednotlivých diagnóz dospělých a dětských pacientů ukazují výše uvedené tabulky v kapitole 4.1.

Pomocí metody real-time PCR byla provedena detailní genotypizace kmenů *Helicobacter pylori* ve tkáňových vzorcích benigních diagnóz, což ukazuje graf 3.



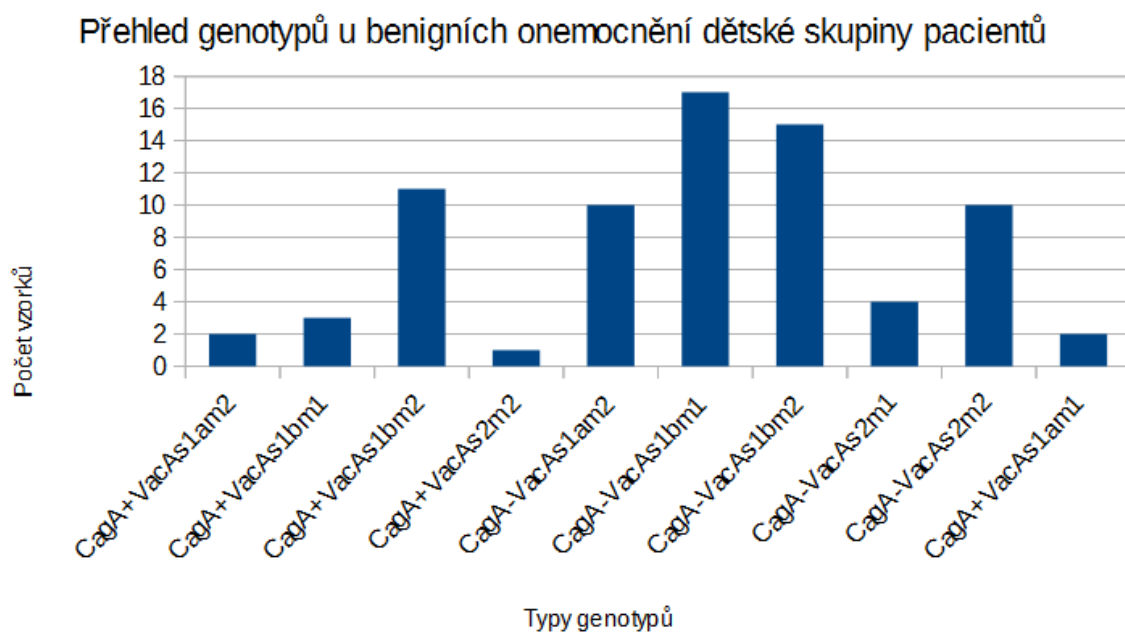
Graf 3: Přehled genotypů u benigních onemocnění dospělé skupiny pacientů

Z daného grafu vyplývá, že nejčastějším genotypem u benigního typu onemocnění (chronická tonsilitida a OSAS) u dospělých pacientů je genotyp **CagA-VacAs1bm1** a genotyp **CagA-**

**VacAs1bm2**, dalším nejčastějším genotypem u skupiny benigních onemocnění je genotyp **CagA-VacAs1am2**.

Tato analýza zjistila, že u benigních onemocnění dospělé skupiny pacientů převažuje VacA pozitivita nad CagA pozitivitou.

Přehled genotypů u benigních onemocnění dětské skupiny pacientů ukazuje graf 4.



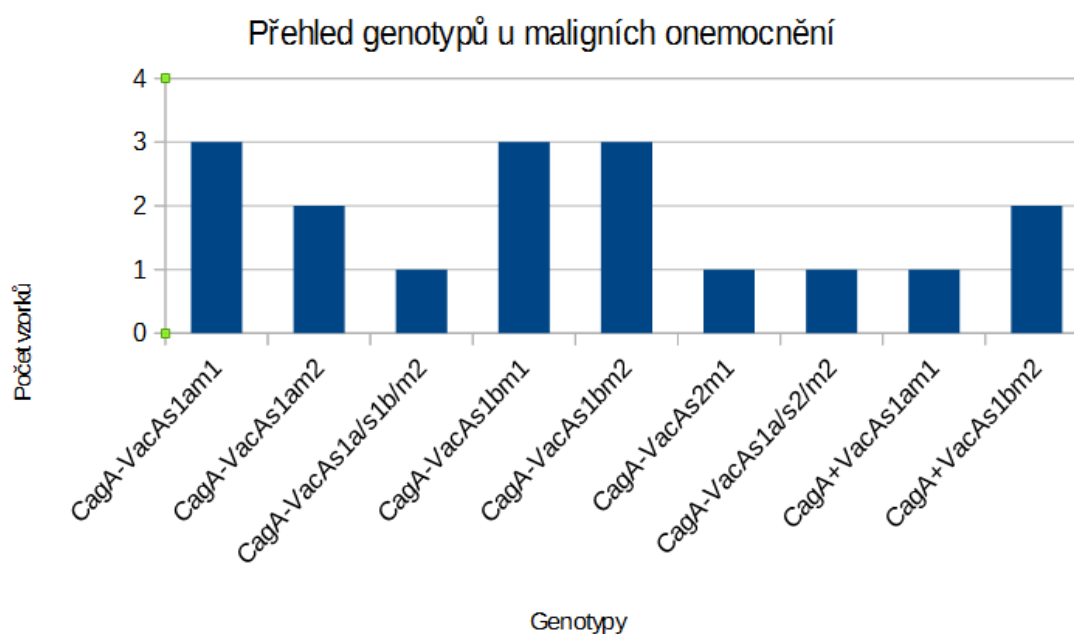
Graf 4: Přehled genotypů u benigních onemocnění dětské skupiny pacientů

Nejčastějším typem genotypu u dětské skupiny benigních onemocnění (adenoidní vegetace, OSAS) je genotyp **CagA-VacAs1bm1**, druhým nejčastějším pak genotyp **CagA-VacAs1bm2**. Lze tak říci, že u benigních onemocnění dětské skupiny opět převažuje pozitivita VacA genu nad CagA genem.

#### 4.2.2 Maligní diagnózy

Do skupiny maligních onemocnění byly zařazeny tonzilární karcinomy (Lukeš et al., 2014). Počet vzorků tonzilárních karcinomů ukazuje tabulka v kapitole 4.1.

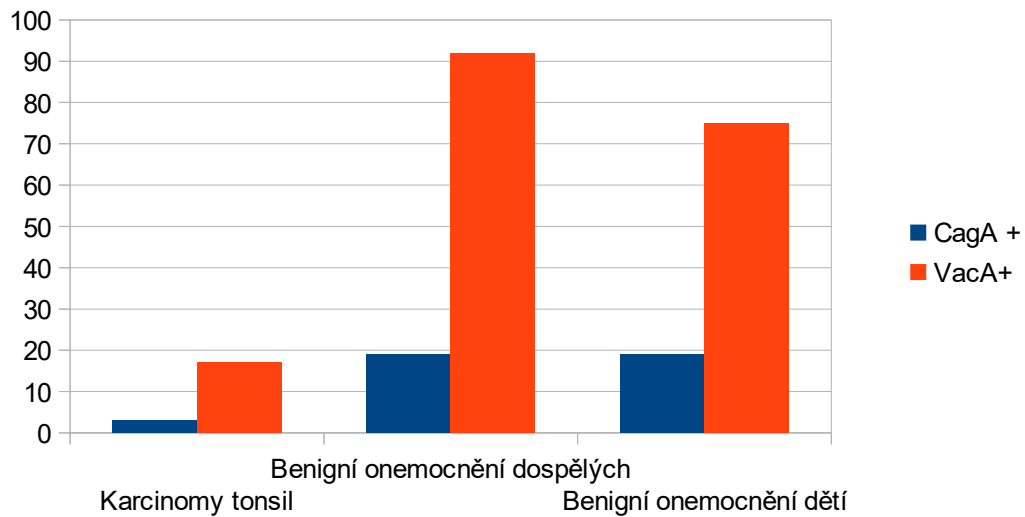
Nejčastějším typem genotypu u tonzilárního karcinomu byl genotyp **CagA-VacAs1bm1**, druhým nejčastějším pak genotyp **CagA-VacAs1bm2**, což znázorňuje graf 5. Stejně tak jako u skupiny benigních onemocnění, převažuje i zde pozitivita VacA genu.



*Graf 5: Přehled genotypů Helicobacter pylori u tonzilárního karcinomu*

### 4.3 Porovnání zastoupení *cagA* genů a *vacA* genů ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu

Níže uvedený graf 6 dokumentuje, že celkově převyšuje zastoupení VacA genotypů v PCR pozitivních vzorcích. Nejvíce pak u skupiny benigních onemocnění dospělých (90%), nejméně u skupiny karcinomu tonsily (15%).



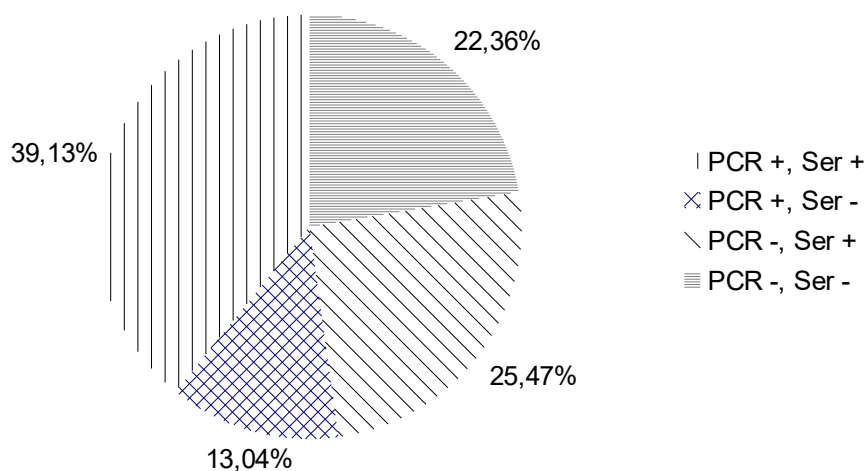
Graf 6: Porovnání zastoupení CagA positivity/VacA positivity ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu

#### 4.4 Zhodnocení argumentu eradikace *Helicobacter pylori* v rámci výskytu *cagA* genu ve Waldeyerově lymfatickém okruhu

Hlavní otázkou kladenou v této části výsledků je, zda současný PCR průkaz a sérologický průkaz *Helicobacter pylori* u pacienta je argumentem k provedení eradikace.

K sérologické detekci (Lukeš et al., 2014; Nártová et al., 2013) bylo použito z celkového počtu skupiny dospělých pacientů celkem 161 vzorků krve (83,42%). Protilátky *Helicobacter pylori* byly prokázány celkem u 104 pacientů (64,60%), u zbylého počtu pacientů (57), tedy 35,40%, sérologická pozitivita prokázána nebyla.

Při porovnání PCR diagnostiky a sérologické diagnostiky práce Lukeše et al. a Nártové et al. (Lukeš et al., 2014; Nártová et al., 2014) popsaly, že celkem 63 PCR pozitivních vzorků bylo zároveň sérologicky pozitivních, 21 PCR pozitivních vzorků bylo sérologicky negativních, 41 PCR negativních vzorků bylo pozitivních sérologicky a 36 PCR negativních vzorků bylo rovněž sérologicky negativních. Uvedené údaje shrnuje graf 7.



Graf 7: Srovnání PCR detekce a sérologické analýzy

Přítomnost specifických HP protilátek u vyšetřovaných pacientů znamená, že daný pacient prodělal nebo prodělává infekci *Helicobacter pylori*. Přítomnost anamnestických protilátek pak pro aktivní infekci HP nesvědčí. V případě přítomnosti IgA, IgM imunoglobulinů je vysoká pravděpodobnost, že pacient infekci HP prodělal, ale také v jiné oblasti než v orofaryngu, např. v žaludku a oblast patrových tonzil tak kolonizována nebyla. Lze rovněž říci, že nulová detekce



protilátek neznamená, že *Helicobacter pylori* není v tonzilách přítomen. Tento fakt zdůrazňuje vysokou sensitivitu PCR metody v detekci *Helicobacter pylori*.

Detekce přítomnosti *Helicobacter pylori* oběma metodami ukázalo přehledově konkordanci u 99 vzorků (61,49%) a diskordanci u 62 vyšetřovaných vzorků (38,51%). 41 diskordantních výsledků bylo sérologicky pozitivních a PCR negativních.

**K porovnání metod PCR a sérologie byl užit Chi-kvadrát test:**

|       | Ser + | Ser - | Suma |  |
|-------|-------|-------|------|--|
| PCR + | 63    | 21    | 84   |  |
| PCR - | 41    | 36    | 77   |  |
| Suma  | 104   | 57    | 161  |  |

*Tabulka 8: Porovnání PCR a serologie*

Na základě  $\chi^2$  testu lze konstatovat, že PCR pozitivita HP ve vyšetřovaných vzorcích je signifikantně rozdílná od sérologické positivity HP (statistický odhad  $\hat{\chi}^2=8,31$  je větší než kvantil). Hladina významnosti byla zvolena  $p < 0,05$ .

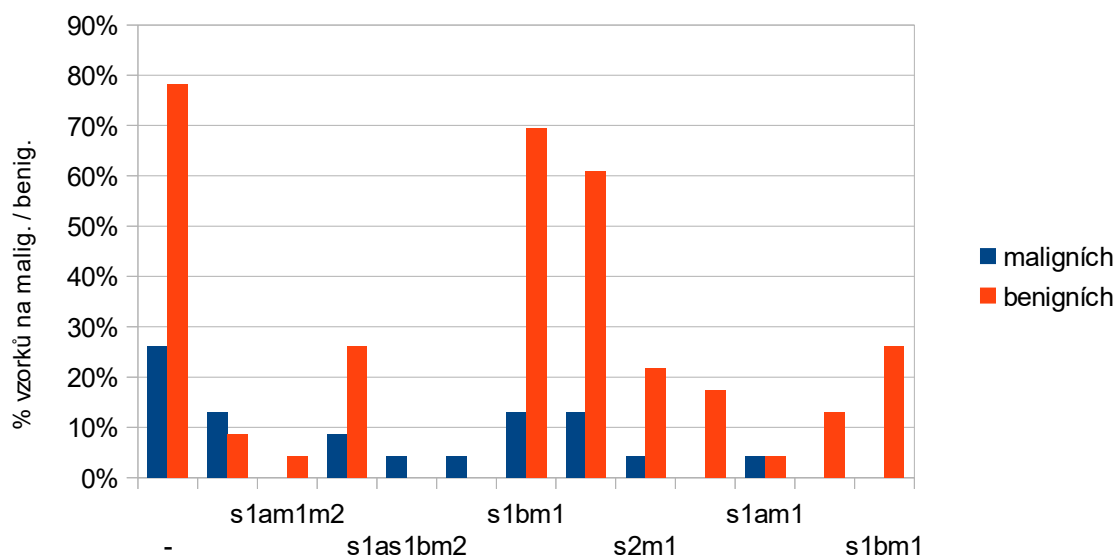
Vzhledem ke skutečnosti, že CagA gen se nachází ve tkáních Waldeyerova lymfatického okruhu v menšině, neexistuje důkaz a z něj prokazatelně podložené doporučení k eradikaci daných pacientů. Otázkou eradikace je interpretace incidence vacA genu.

Ve statistickém zpracování byla užitá metoda Chi-kvadrát testu v práci Lukeše a v práci Nártové (Lukeš et al., 2014; Nártová et al., 2014). Lukeš (Lukeš et al., 2014) pomocí Chi-kvadrát testu dokázal, že pozitivita HP není signifikantně rozdílná mezi skupinou chronických tonzilitid a skupinou tumorů ( $p=0,7754$ ), mezi skupinou OSAS a skupinou chronické tonzilitidy ( $p=0,9625$ ) či mezi skupinou OSAS a skupinou tonzilárních karcinomů ( $p=0,7632$ ). Rovněž Nártová (Nártová et al., 2014) prokázala pomocí Chi-kvadrát testu, že prevalence HP není signifikantně rozdílná u skupiny pacientů s chronickou tonsilitidou a OSAS ( $p=0,76$ ), stejně tak, že není signifikantní rozdíl ve výskytu cagA genu mezi těmito dvěma skupinami pacientů ( $p=0,69$ ) při  $p < 0,05$ .

Pro jednotlivé typy genotypů byl spočítán počet vzorků tkáně chronické tonzilitidy a karcinomu tonzily. Na základě těchto hodnot byl vypočten **Pearsonův korelační koeficient**, který má hodnotu **0,59**. Na základě této hodnoty lze říci, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi konkrétním typem genotypu a chronickým zánětem/karcinomem tonzily. ( $R=0,59$ , úplná korelace =1).

|                |       |       | <b>maligni</b> | <b>benigni</b> |       |
|----------------|-------|-------|----------------|----------------|-------|
| cagA-          | VacA- | -     | 6              | 18             |       |
|                |       | VacA+ | 3              | 2              |       |
|                |       |       | s1am1          | 0              | 1     |
|                |       |       | s1am1m2        | 2              | 6     |
|                |       |       | s1am2          | 1              | 0     |
|                |       |       | s1as1bm2       | 1              | 0     |
|                |       |       | s1as2m2        | 3              | 16    |
|                |       |       | s1bm1          | 3              | 14    |
|                |       |       | s1bm2          | 1              | 5     |
|                |       |       | s2m1           | 0              | 4     |
|                |       |       | s2m2           | 1              | 1     |
|                |       |       | cagA+          | VacA+          | s1am1 |
| s1am2          | 0     | 6     |                |                |       |
| s1bm1          | 2     | 3     |                |                |       |
| s1bm2          | 0     | 1     |                |                |       |
| s2m1           | 0     | 1     |                |                |       |
| s2m2           | 0     | 1     |                |                |       |
| <b>Celkem:</b> |       |       | <b>23</b>      | <b>80</b>      |       |

*Tabulka 9: Počty jednotlivých genotypů u chronické tonzilitidy a tonzilárního karcinomu*



Graf 8: Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů u chronické tonsilitidy a tonzilárního karcinomu

Kultivace byla odebrána u 45 dospělých pacientů (11 pacientů s karcinomem tonzily, 22 s chronickou tonsilitidou a 12 pacientů se SAS), z čehož byl *Helicobacter pylori* prokázán pouze u 3 (6,67%).

## 5 Diskuse

*Helicobacter pylori* (HP) je kosmopolitní bakterie. DNA bakterie byla prokázána Marshalllem a Warrenem (Marshall a Warren, 1984).

Jedním z cílů dizertační práce bylo prokázat možnou kolonizaci lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu *Helicobacter pylori*. V práci Karczewske (Karczewska et al., 2002) byl prokázán výskyt HP v dentálním plaku, který je považován za extragastrický zdroj HP. Neexistují přesvědčivé studie, dokazující definitivně detekci infekce HP v orofaryngeální lymfatické tkáni. Práce, zabývající se detekcí HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu vykazují rozdílné výsledky (Skinner et al., 2001; Cirak et al., 2003; Kusano et al., 2007). Detekce HP v orofaryngeální lymfatické tkáni byla úspěšná v rozsahu 0-90% (Dowsett a Kowolik, 2003).

Není zcela jednoduché srovnávat výsledky jednotlivých prací, zabývajících se detekcí HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, neboť autoři každé práce užíli k průkazu přítomnosti bakterie odlišné diagnostické metody, jak ukazuje tabulka v literárním úvodu práce. Obecně lze říci, že autoři využívají k průkazu jak metod invazivních, tak metod neinvazivních. Často užívanou invazivní metodou je RUT ( rychlý ureázový test) a CLO test ( campylobacter – like test). Tyto testy byly užity např. V práci Skinnera z roku 2001 (Skinner et al., 2001), který pomocí CLO testu detekoval z 50 vzorků tonzilární tkáně HP v 0% případů. Pozitivitu HP v tonzilární tkáni pomocí CLO testu neprokázal ani Yilmaz v roce 2004 (Yilmaz et al., 2004). Naopak Bitar prokázal v roce 2005 pozitivitu v adenodní tkáni v 84% případů (Bitar et al., 2005). Vayisoglu pak v roce 2008 prokázal pozitivitu HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu pomocí RUT ve 2 vzorcích (Vayisoglu et al., 2008). Větší úspěch při použití RUT při detekci HP v této oblasti měl Abdel – Monem v roce 2011, který prokázal celkem 16 pozitivních vzorků (Abdel-Monem et al., 2011).

V našich pracích metoda RUT využita nebyla. Důvodem byl poměrně nízký záchyt positivity HP touto metodou v předchozích studiích a také předpoklad, že oblast lymfatické tkáně orofaryngu je osídlena také jinými bakteriálními kmeny, které produkují ureázu a mohou tak HP inhibovat. Testy pak vykazují falešně pozitivní výsledky (Dowsett a Kowolik, 2003). Metoda je proto vhodnější pro detekci žaludečních vzorků. Midolo zdůrazňuje v roce 2000 sensitivitu této metody 93% a specifitu 98% (Midolo a Marshall, 2000).

Metodou kultivační se ve své práci zabývali Lukeš et al. (Lukeš et al., 2014). Ve své práci prokázali kultivační metodou celkem 3 pozitivní vzorky ze 45. Hlavním argumentem je možné ovlivnění kultivační detekce externími vlivy (Dowsett a Kowolik, 2003) či přerůstání HP jinými kmeny. Přímou inhibici orálními kmeny in vitro popisuje ve své práci Ishihara v roce 1997 (Ishihara et

al., 1997). Možná je rovněž transformace v kokoidní formy, které nejsou kultivovatelné (Shahamat et al., 2004). Rovněž Yilmaz užil v roce 2006 ve své práci kultivační průkaz HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, kdy celkem 11 adenoidních a 12 tonzilárních vzorků bylo pozitivních (Yilmaz et al., 2006). Obecně je kultivace považována za zlatý standard v detekci žaludeční HP s 80-90% sensitivitou a 90-100% specificitou (Makrithathis et al., 2004).

Z metod neinvazivních jsme v našich pracích užili sérologický průkaz specifických protilátek HP (Lukeš et al., 2014; Nártová et al., 2014). K sérologické detekci bylo použito z celkového počtu skupiny dospělých pacientů celkem 161 vzorků krve (83,42%). Protilátky proti *Helicobacter pylori* byly prokázány celkem u 104 pacientů (64,60%), u zbylého počtu pacientů (57), tedy 35,40%, sérologická pozitivita prokázána nebyla. Obecně lze říci, že sérologická pozitivita nevypovídá o současné probíhající infekci HP a není určujícím faktorem pro zahájení antibiotické terapie HP (Testerman a Morris, 2014). Sérologický průkaz protilátek HP má klinický význam především pro dlouhodobé sledování po léčbě a pro monitorování úspěchu eradikace HP. Protilátky IgG v séru často přetrvávají až půl roku po prodělané infekci HP. Lukeš detekoval v lymfatické orofaryngeální tkáni 12 PCR pozitivních vzorků bez současného průkazu protilátek u daných pacientů. Možným vysvětlením je časná detekce HP, následující brzy po primární infekci, kdy imunitní systém ještě neprodukuje protilátky v nadbytku. Pro toto svědčí i fakt, že 9 z 12 lidí v Lukešově práci bez průkazu protilátek bylo PCR pozitivní pro méně virulentní genotypy HP s1/m2 v lymfatické tkáni orofaryngu. Důležitým faktem může být ale také skutečnost, že HP se v lymfatické tkáni orofaryngu mohl nacházet v kokoidních formách, dlouhodobě přežívajících. Podobně jako Lukeš se sérologií HP v oblasti orofaryngu zabýval Bürgers v roce 2008, který detekoval HP ve slinách bez průkazu protilátek (Bürgers et al., 2008).

V našich pracích jsme jako hlavní detekční metodu užili metodu invazivní molekulární – PCR, resp. real-time PCR. Jedná se o metodu s nejvyšší sensitivitou a specificitou 100% (Testerman a Morris, 2014). V experimentech bylo užito mnoho variací PCR s detekcí 0-90% (Dowsett a Kowolik, 2003). Různorodost spočívala v užití odlišných typů primerů a sond k detekci různých segmentů DNA HP, např. primery pro ureázový gen, primery pro 16s ribosomální RNA gen, 23S ribosomální RNA gen (Yilmaz et al., 2006; Abdel-Monem et al., 2011). Specificita a sensitivita primerů je velmi odlišná (Song et al., 1999). Genotypizace umožňuje rozlišit přítomné geny HP, kódující virulentní faktory a rozlišit tak vysoce virulentní a méně virulentní kmeny (Pavlík et al., 2007). Diskrepance mezi publikovanými PCR výsledky pak ukazuje na důležitost výběru vhodné PCR assaye.

V souboru příložených prací jsme prokázali přítomnost DNA v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, resp. tonzilární a adenoidní tkáni. Prokázali jsme rovněž přítomnost vysoce virulentního *cagA* genu a méně virulentního *vacA* genu. Z celkového počtu vzorků lymfatické tkáně u dospělých

pacientů jsme prostřednictvím PCR metody prokázali přítomnost u 112 z nich (77,24%), v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu u dětí pak z celkového počtu 79 vzorků u 75 z nich (94,94%). Jednoznačně lze tedy říci, že lymfatická tkáň Waldeyerova okruhu je extragastrickým rezervoárem HP. Toto tvrzení podporuje i práce Pavlíka z roku 2015 (Pavlik et al., 2015), oproti tomu práce Aliakbari z roku 2011 toto tvrzení zpochybňuje (Aliakbari et al., 2011).

Metodu PCR k detekci HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu užila ve svých pracích řada autorů, jejichž výsledky jsou v souladu či v rozporu s našimi daty. Bonaventura v roce 2000 zpochybnil tonzilární tkáň jako extragastrický rezervoár HP a ve své práci detekoval 0 pozitivních vzorků metodou PCR (Bonaventura et al., 2001). Studie Ciraka z roku 2003 naopak zachycuje z 23 adenotonsilárních vzorků PCR pozitivitu v 7 (30%), z toho cagA pozitivitu u 5 vzorků. Stejně tak Bukut v roce 2005 prokázal z celkem 71 vzorků PCR pozitivitu u 29 z nich, v 17 z těchto pak cagA pozitivitu, což podporuje naše výsledky. Podpořil rovněž stejně jako naše práce možnou roli HP v rekurentních adenotonzilitidách a adenotonzilární hypertrofii (Bulut et al., 2006). Oproti tomu Bitar v roce 2005 detekoval 0 pozitivních vzorků metodou nested PCR (Bitar et al., 2005). V souladu s našimi pracemi je studie Yilmaze z roku 2006 (Yilmaz et al., 2006) a studie Kusana z roku 2007 (Kusano et al., 2007). Potenciální vliv HP na vznik chronické adenotonzilitidy u dětí byl zpochybněn prací Vayisogla z roku 2008 (Vayisoglu et al., 2008). Naše výsledky naopak podporuje práce Mogghadama z roku 2009 (Jabbari Moghaddam et al., 2009). Abdel-Monem pak detekoval ve své práci ureázový gen u 5 tkáňových vzorků (Abdel-Monem et al., 2011). Farivan a Najafipour detekovali užitím scorpion PCR vysoký výskyt HP v lymfatické tkáni u pacientů s chronickou tonzilitidou (Farivar et al., 2012; Najafipour et al., 2012). Práce Cedeno z roku 2016 nepotvrdila pozitivitu HP v adenoidní tkáni pomocí metody PCR. Hwang ve své metaanalýze z roku 2016 zcela popírá roli HP při vzniku chronické tonsilitidy (Hwang et al., 2015). Kaymakçı v roce 2015 vyhodnotil celkem z 23 vzorků adenotonzilární tkáně u dětí pomocí metody PCR 2 pozitivní vzorky. Připustil však fakt, že role HP ve vzniku hypertrofie adenoidní tkáně vyžaduje ještě další studie (Kaymakçı, 2014). Bayindir pak v roce 2015 detekoval pozitivní vzorky adenotonzilární tkáně pomocí metody PCR a připustil možnou roli HP při vzniku chronické adenotonzilitidy v endemických oblastech (Bayindir et al., 2015). Oproti většině prací detekovali ve svých studiích Kraus i Katra vysoké množství PCR pozitivních tkání Waldeyerova lymfatického okruhu na přítomnost HP (Kraus et al., 2014; Katra et al., 2014).

Dizertační práce ukazuje na zvýšený výskyt méně virulentních genotypů HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, tedy genotypů cagA negativních, vacA pozitivních.

Analýza genotypů HP v tonzilární tkáni u dospělých jedinců v dizertační práci ukazuje na zvýšený výskyt s1/m2 alel vacA genu a s1/m1 alel vacA genu. CagA gen byl nalezen pouze v malém

počtu případů, v práci Lukeše v 5 tkáňových vzorcích, v práci Nártové v 17 tkáňových vzorcích. Přehledný výskyt vacA a cagA genotypů ukazuje v kapitole Výsledky graf 5.

Tento nálezn vypovídá o tom, že méně virulentní kmeny HP mají v lymfatické tonzilární tkáni u dospělých jedinců v našich studiích dominanci. Nález genotypu s2/m1 byl v naší studii minimální, v literatuře byl publikován pouze v ojedinělých studiích (Letley et al., 1999). Na základě srovnání našich výsledků a výsledků jiných studií můžeme říci, že lymfatická tkáň Waldeyerova okruhu je extragastrickým rezervoárem HP. Naše data podporují vysokou sensitivitu a specifitu zvolené modifikace PCR metody. Rovněž podporují hypotézu, že HP je potenciálním etiologickým faktorem při patogenezi chronické tonzilitidy, neboť ve vzorcích detekovaných pacientů s touto diagnózou se ukázala vysoká přítomnost genotypů vacA s1m1.

Zajímavým faktem je přebytek cagA negativních genotypů v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, což vede k úvaze, že CagA protein, jakožto hlavní virulentní faktor v žaludku, nehraje v oblasti lymfatické tkáně orofaryngu a epifaryngu důležitou infekční roli. Naopak dlouhodobá kolonizace cagA negativními kmeny HP v této oblasti a tedy potenciální pomalá alterací imunitního systému může vést ke vzniku chronického zánětu a v pozdější fázi k iniciaci kancerogeneze. Tuto teorii popírá práce Aliakbari (Aliakbari et al., 2011), rovněž tak metaanalýza Hwanga z roku 2015 (Hwang et al., 2015).

Práce Katry a Krause rovněž prokázaly přítomnost HP v dětské adenoidní tkáni a v dětské tonzilární tkáni (Katra et al., 2014; Kraus et al., 2014). Hlavními genotypy u dětí byly stejně tak jako u dospělé skupiny pacientů s1m1 a s1 m2. Dle našich výsledků lze tedy i adenotonzilární tkáň u dětí považovat za extragastrický rezervoár HP.

V rámci tonzilárního karcinomu byl nejčastějším genotypem také s1m1/ s1m2, stejně jako u skupiny chronických tonsilitid. Tento fakt přispívá k úvaze vzájemného vztahu chronické tonsilitidy jako prekancerózy k malignímu onemocnění.

Naše práce si rovněž pokládá otázku významu eradikace u pacientů s nálezem HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, zvláště pak u pacientů s chronickou tonzilitidou. I přes významně vyšší výskyt cagA negativních kmenů by eradikace mohla bránit rozvoji dalších patologií. Teorii, že HP je rezidentem lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu podporuje práce Pavlíka (Pavlik et al., 2015), která rovněž připouští možnou transformaci v maligní onemocnění a tedy nepřímo podporuje prospěšnost eradikace. Skutečnost, že HP je primárním kolonizátorem lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu podporuje práce Lukeše z roku 2010, kdy byly nalezeny odlišné genotypy HP v orofaryngeální lymfatické tkáni a v žaludku u 6 jedinců (Katra et al., 2014). Tento fakt opět přispívá k provádění eradikace u pacientů s pozitivitou HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu.

Otázka prospěšnosti eradikace však plně doposud zodpovězená není a je třeba, aby byla předmětem dalších studií. Z ekonomického hlediska by antibiotická terapie byla mnohonásobně výhodnější, než následná ORL - chirurgická a onkologická léčba pacientů. Je však nutno získat silnější data a podpořit je statisticky.



## 6 Závěr

Uložené cíle dizertační práce byly splněny.

V lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, resp. v tonzilární a adenoidní tkáni dospělých a dětských pacientů, jsme pomocí užší modifikace metody PCR (real-time PCR) prokázali přítomnost DNA HP. Provedli jsme následnou genotypizaci tkáňových vzorků a vyhodnotili jsme tak zastoupení jednotlivých genotypů HP v avizované oblasti. Byl zkoumán jejich etiologický vliv na vznik benigních i maligních onemocnění ve Waldeyerově okruhu.

Oblast Waldeyerova okruhu lze dle našich dat považovat za extragastrický rezervoár HP u dospělých i dětí. Přítomnost HP není závislá na typu oro/epifaryngeálního onemocnění a je pozitivní jak u skupiny benigních, tak u skupiny maligních onemocnění.

Genotypizací byly zjištěny rozdíly mezi oro/epifaryngeálními kmeny a kmeny žaludečními, respektive byla zjištěna nízká přítomnost cagA pozitivních kmenů. U pacientů s karcinomem tonzily byl rovněž zjištěn vysoký výskyt vacA pozitivních, tedy méně virulentních kmenů.

Kultivační průkaz byl prokázán pouze ve třech případech a sérologická pozitivita rovněž nebyla prokázána u všech pacientů. Tento fakt vyzdvihuje vysokou sensitivitu a specifitu použité PCR metody.

**Hypotéza č. 1 byla na základě výsledků potvrzena.** DNA HP se nachází v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu u dospělé skupiny pacientů v 77,24% vzorků a u skupiny dětí v 94,94% vzorků. Výskyt tak lze považovat za vysoký.

**Hypotéza č.2, eradikace u pacientů s PCR pozitivitou a zároveň sérologickou pozitivitou je indikována, nebyla v našich pracích potvrzena, je předmětem dalších studií a nelze ji tedy přijmout.** PCR pozitivita a zároveň pozitivita protilátek se ukázala v 39,13% případů, PCR pozitivita a sérologická negativita pak u 13,04%, 25,47% bylo PCR negativních a sérologicky pozitivních, zbytek (22,36%) bylo negativních sérologicky i PCR. Metoda sérologická není jednoznačně vypovídající o tom, zda se jedná o recentní či již proběhlou infekci, neboť HP protilátky se nevytváří ihned po vzniku primární infekce a zároveň přetrvávají v organismu poměrně dlouho. V některých případech může být sérologie negativní v důsledku přítomnosti málo virulentních kmenů, které neinicují tvorbu protilátek či v důsledku výskytu kokoidních forem, což by i potvrdzovalo nízkou kultivační výtěžnost v naší práci.

**Hypotéza č. 3**, tedy otázka existence korelace mezi konkrétními typy genotypů a chronickým zánětem či maligním onemocněním lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu, **potvrzena nebyla**.

Pro jednotlivé typy genotypů byl spočítán počet vzorků tkáně chronické tonzilitidy a karcinomu tonzily. Na základě těchto hodnot byl vypočten **Pearsonův korelační koeficient**, který má hodnotu **0,59**. Na základě této hodnoty lze říci, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi konkrétním typem genotypu a chronickým zánětem/karcinomem tonzily. ( $R = 0,59$ , úplná korelace = 1).

## 7 Příloha

### 7.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertační práce

#### 7.1.1 Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce

1. **Nártová, E.**, Kraus J., Pavlík E., Lukeš P., Katra, R., Plzák, J., Kolářová L., Šterzl I., Betka J., Astl J.: presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271:607–613 (**IF 1,458**)
2. Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B., **Nártová E.** et al.: Detection of *Helicobacter pylori* in oropharyngeal lymphatic tissue with real – time PCR and assessment of its carcinogenic potencial, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271:399–405 (**IF 1,458**)
3. Kraus, J., **Nártová E.**, Pavlík E., Katra, R. et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar hypertrophy in children, *Acta Otolaryngol*, 2014, 134: 88-92 (**IF 0,99**)
4. Katra, R., Kabelka, Z., Jurovčík M., Hradský, O., Kraus, J., Pavlík, E., **Nártová, E.** et al.: *Helicobacter pylori* in adenoid hyperplasia and reflux episodes detected by multiple intralunimanl impedance in children, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78: 1243–1249 (**IF 1,447**)

#### 7.1.2 Publikace bez IF

1. **Nártová E.**, Lukeš P., Pavlík E., Šterzl I., Astl J., Betka J., The presence of *Helicobacter pylori* in oropharynx and its influence to the gastric infection, *Otorinolaryng. a Foniatr. (Prague)*, 58, 2009, č. 2, s. 97-101.
2. Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B, Plzák J, **Nártová E.**, Doseděl J, Katra R, Sterzl I, Betka J, Astl J.: Comparison of *Helicobacter pylori* genotypes obtained from the oropharynx and stomach of the same individuals - a pilot study, *Prague Med Rep.* 2012;113(3):231-9.
3. **Nártová, E.**, Astl, J., Lukeš,P., Katra,P., Pavlík,E., Betka,J.: *Helicobacter pylori* a jeho úloha v patogenezi a patologii orofaryngu a epifaryngu ve vztahu k ORL onemocněním, *Otorinolaryng a Foniatr. (Prague)*, 61, 2012, č. 2, s. 120-129.
4. Pavlík, E., **Nártová, E.**, Astl, J. et al.: Detection of *Helicobacter pylori* and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area, *AJCEM (American Journal of Clinical and Experimentatl Medicine)*, 2015; 3(6): 364 – 367.

## 8 Literatura

- Abdel-Monem, MH, Magdy, EA, Nour, YA, Harfoush, RA, Ibreak, A. 2011. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue of children with chronic adenotonsillitis using rapid urease test, PCR and blood serology: a prospective study. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 75: 568–72.
- Aliakbari, I, Noohi, S, Safavi, SA, Tabrizi, AG, Bolfion, M, Razaghi, M, Goudarzi, H, Dabiri, H. 2011. The role of adenotonsillar tissues as a reservoir for *Helicobacter pylori* and *Helicobacter hepaticus*. *Gastroenterol. Hepatol. from bed to bench* 4: 153–8.
- Amizadeh, M, Shamsadini, A, Arabzadeh, A, Jazayeri, S. 2015. Association of *cagA* Positive *Helicobacter pylori* Infection and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: A PCR Approach. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 67: 51–55.
- Aydın, E, Aydoğan, F, Taştan, E, Arslan, N, Karaca, G. 2014. Does *Helicobacter Pylori* Have a Role in the Etiology of Adenoid Hypertrophy? *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 66: 65–70.
- Backert, S, Selbach, M. 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis.
- Bayindir, T, Toplu, Y, Otlu, B, Yakupogullari, Y, Yildirim, O, Kalcioğlu, MT. 2015. Prevalence of the *Helicobacter pylori* in the tonsils and adenoids. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 81: 307–311.
- Bednář, M a kol.: *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha, 1996
- Bitar, MA, Soweid, A, Mahfouz, R, Zaatari, G, Fuleihan, N. 2005. Is *Helicobacter pylori* really present in the adenoids of children? *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 262: 987–92.
- Bitar, M, Mahfouz, R, Soweid, A, Racoubian, E, Ghasham, M, Zaatari, G, Fuleihan, N. 2006. Does *Helicobacter pylori* colonize the nasopharynx of children and contribute to their middle ear disease? *Acta Otolaryngol* 126: 154–159.
- Bode, G, Mauch, F, Malfertheiner, P. 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 111: 483–90.
- Bonaventura, G d., Neri, M, Neri, G, Catamo, G, Piccolomini, R. 2001. Do Tonsils Represent an Extragastric Reservoir for *Helicobacter pylori* infection. *J. Infect.* 42: 221–222.
- Boncrisiano, M, Paccani, SR, Barone, S, Ulivieri, C, Patrussi, L, Ilver, D, Amedei, A, D'Elis, MM, Telford, JL, Baldari, CT. 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 198: 1887–97.
- Brown, LM. 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22: 283–297.
- Bulut, Y, Agacayak, A, Karlidag, T, Toraman, ZA, Yilmaz, M. 2006. Association of *cagA*+ *Helicobacter pylori* with adenotonsillar hypertrophy. *Tohoku J. Exp. Med.* 209: 229–33.
- Bureš, J, Kopáčová, M, Koupil, I, Voříšek, V, Rejchrt, S, Beránek, M, Seifert, B, Pozler, O, Živný, P, Douda, T, Kolesárová, M, Pintér, M, Palička, V, Holčík, J, Jančová, E, Hanka, V, Ponížil, M, Janík, K, Koudelka, T, Holdšvendová, I, Appelt, J, Balatková, R, Šrůtková, J, Charvátová, M, Seifert, B, Koudelková, G, Šircová, M, Bumbová, I, Herber, O, Charvátová, E, Čermáková, Š,

- Kliková, O, Seifertová, J. 2006. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in the Czech Republic. *Helicobacter* 11: 56–65.
- Bürgers, R, Schneider-Brachert, W, Reischl, U, Behr, A, Hiller, K-A, Lehn, N, Schmalz, G, Ruhl, S, Brgers, 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.
- Cedeño, EEG, Ortiz-Princz, D, Figueredo, SAC, Porro, MEC. 2016. Adenoid hypertrophy and chronic rhinosinusitis: *Helicobacter pylori* on antral lavages, adenoid tissue and salival immunoglobuline A on paediatric patients. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 80: 82–87.
- Cirak, MY, 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. Neck Surg.* 129: 1225.
- Czesnikiewicz-Guzik, M, Bielanski, W, Guzik, TJ, Loster, B, Konturek, SJ. 2005. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 Suppl 6: 77–89.
- Dayama, A, Srivastava, V, Shukla, M, Singh, R, Pandey, M. 2011. *Helicobacter pylori* and oral cancer: possible association in a preliminary case control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12: 1333–6.
- Doorn, L-J van. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1: 290–298.
- van Doorn, LJ, Figueiredo, C, Sanna, R, Pena, S, Midolo, P, Ng, EK, Atherton, JC, Blaser, MJ, Quint, WG. 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2597–603.
- Dowsett, SA, Kowolik, MJ. 2003. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14: 226–33.
- Dzierżanowska-Fangrat, K, Lehours, P, Megraud, F, Dzierżanowska, D. 2006. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 11: 6–13.
- Espinoza, MGC, Vazquez, RG, Mendez, IM, Vargas, CR, Cerezo, SG. 2011. Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1650–2.
- Eyigor, M, Eyigor, H, Gultekin, B, Aydin, N. 2009. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue specimens by rapid urease test and polymerase chain reaction. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 266: 1611–3.
- Farivar, TN, Pahlevan, A, Johari, P, Safdarian, F, Mehr, MA, Najafipour, R, Ahmadpour, F. 2012. Assessment of *Helicobacter pylori* prevalence by scorpion real-time PCR in chronic tonsillitis patients. *J. Glob. Infect. Dis.* 4: 38–42.
- Gobert, AP, Mersey, BD, Cheng, Y, Blumberg, DR, Newton, JC, Wilson, KT. 2002. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 168: 6002–6.

- Gong, H, Shi, Y, Zhou, L, Tao, L, Ji, J, Chen, H. 2010. [Helicobacter pylori infection: a potential pathogenic factor for laryngeal squamous cell carcinoma]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 45: 839–42.
- Guclu, O, Akcali, A, Sahin, EM, Tekin, K, Barutcu, O, Tatman Otkun, M, Derekoy, FS. 2013. Relationship between Helicobacter pylori Adenotonsillar Colonization and Frequency of Adenotonsillitis in Children. Balkan Med. J. 30: 301–304.
- Guilemany, JM, Langdon, C, Ballesteros, F, Blanch, JL. 2014. Prognostic significance and association of Helicobacter pylori infection in pharyngolaryngeal cancer. Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology 271: 2539–2543.
- Hatakeyama, M. 2008. SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 11: 30–37.
- Hatakeyama, M. 2006. The Role of Helicobacter pylori CagA in Gastric Carcinogenesis. Int. J. Hematol. 84: 301–308.
- Höcker, M, Hohenberger, P. 2003. Helicobacter pylori virulence factors--one part of a big picture. Lancet 362: 1231–3.
- Hwang, MS, Forman, SN, Kanter, JA, Friedman, M. 2015. Tonsillar *Helicobacter pylori* Colonization in Chronic Tonsillitis. JAMA Otolaryngol. Neck Surg. 141: 245.
- Ishihara, K, Miura, T, Kimizuka, R, Ebihara, Y, Mizuno, Y, Okuda, K. 1997. Oral bacteria inhibit Helicobacter pylori growth. FEMS Microbiol. Lett. 152: 355–61.
- Israel, DA, Peek, RM. 2001. Review article: Pathogenesis of helicobacter pylori-induced gastric inflammation. Aliment. Pharmacol. Ther. 15: 1271–1290.
- Jabbari Moghaddam, Y, Rafeey, M, Radfar, R. 2009. Comparative assessment of Helicobacter pylori colonization in children tonsillar tissues. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 73: 1199–201.
- Jelavic, B, Bevanda, M, Ostojic, M, Leventic, M, Vasilj, M, Knezevic, E. 2007. Tonsillar colonization is unlikely to play important role in Helicobacter pylori infection in children. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 71: 585–90.
- Karczewska, E, Konturek, JE, Konturek, PC, Cześnikiewicz, M, Sito, E, Bielański, W, Kwiecień, N, Obtulowicz, W, Ziemiak, W, Majka, J, Hahn, EG, Konturek, SJ. 2002. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by Helicobacter pylori. Dig. Dis. Sci. 47: 978–86.
- Katra, R, Kabelka, Z, Jurovcik, M, Hradsky, O, Kraus, J, Pavlik, E, Nartova, E, Lukes, P, Astl, J. 2014. Pilot study: Association between Helicobacter pylori in adenoid hyperplasia and reflux episodes detected by multiple intraluminal impedance in children. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 78: 1243–1249.
- Kaymakçı, M. 2014. Detection of Helicobacter pylori in adenoid tissue by real-time polymerase chain reaction. Turkish J. Ear Nose Throat 24: 78–82.
- Khademi, B, Niknejad, N, Gandomi, B, Yeganeh, F. 2007. Comparison of Helicobacter pylori colonization on the tonsillar surface versus tonsillar core tissue as determined by the CLO test. Ear. Nose. Throat J. 86: 498–501.

- Kocna, P. 2006. Dechové testy-moderní, neinvazivní diagnostika. *Interní Med.*: 336–341.
- Konturek, PC, Konturek, SJ, Bielanski, W, Karczewska, E, Pierzchalski, P, Duda, A, Starzynska, T, Marlicz, K, Popiela, T, Hartwich, A, Hahn, EG. 1999. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. *J. Physiol. Pharmacol.* 50: 857–73.
- Krajden, S, Fuksa, M, Anderson, J, Kempston, J, Boccia, A, Petrea, C, Babida, C, Karmali, M, Penner, JL. 1989. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1397–8.
- Kraus, J, Nartova, E, Pavlik, E, Katra, R, Sterzl, I, Astl, J. 2014. Prevalence of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar hypertrophy in children. *Acta Otolaryngol.* 134: 88–92.
- Kusano, K, Inokuchi, A, Fujimoto, K, Miyamoto, H, Tokunaga, O, Kuratomi, Y, Shimazu, R, Mori, D, Yamasaki, F, Kidera, K, Tsunetomi, K, Miyazaki, J. 2010. Coccoid *Helicobacter pylori* exists in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy. *J. Gastroenterol.* 45: 406–412.
- Kusano, K, Tokunaga, O, Ando, T, Inokuchi, A. 2007. *Helicobacter pylori* in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy compared with those of patients with recurrent pharyngotonsillitis. *Hum. Pathol.* 38: 1788–1797.
- Letley, DP, Lastovica, A, Louw, JA, Hawkey, CJ, Atherton, JC. 1999. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1203–5.
- Logan, RP. 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet (London, England)* 344: 1078–9.
- Lukes, P, Astl, J, Pavlík, E, Potuzníková, B, Sterzl, I, Betka, J. 2008a. *Helicobacter pylori* in tonsillar and adenoid tissue and its possible role in oropharyngeal carcinogenesis. *Folia Biol. (Praha).* 54: 33–9.
- Lukes, P, Pácová, H, Kucera, T, Veselý, D, Martínek, J, Astl, J. 2008b. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and caspase-3 in tonsillar cancer, chronic tonsillitis and healthy tonsils. *Folia Biol. (Praha).* 54: 141–5.
- Lukeš, P, Pavlík, E, Potuznikova, B, Nartova, E, Foltynova, E, Plzak, J, Katra, R, Sterzl, I, Bartunkova, J, Betka, J, Astl, J. 2014. Detection of *Helicobacter pylori* in oropharyngeal lymphatic tissue with real-time PCR and assessment of its carcinogenic potential. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 271: 399–405.
- Madani, S, Rabah, R, Tolia, V. 2000. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection from antral biopsies in pediatric patients is urease test that reliable? *Dig. Dis. Sci.* 45: 1233–7.
- Makrithatis, A, Hirschl, AM, Lehours, P, Megraud, F. 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 9: 7–14.
- Marshall, BJ, Warren, JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet (London, England)* 1: 1311–5.
- Mégraud, F. 2007. Detection of *Helicobacter pylori* and its sensitivity to antibiotics. A step forward in the use of molecular methods. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 31: 790–1.

- Mégraud, F. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Baillieres. Clin. Gastroenterol. 9: 507–18.
- Midolo, P, Marshall, BJ. 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Urease tests. Gastroenterol. Clin. North Am. 29: 871–8.
- Minocha, A, Raczkowski, CA, Richards, RJ. 1997. Is a history of tonsillectomy associated with a decreased risk of *Helicobacter pylori* infection? J. Clin. Gastroenterol. 25: 580–2.
- Montealegre O, MC, Jaramillo H, CA, Montealegre L, G, Parra G, G, Echeverry de P, MM, Delgado P, M del P. 2010. [Molecular and histological detection of *Helicobacter pylori* and genotyping based on *babA2* and *iceA* in patients with benign gastric pathologies]. Rev. Chilena Infectol. 27: 112–8.
- Najafipour, R, Farivar, TN, Pahlevan, AA, Johari, P, Safdarian, F, Asefzadeh, M. 2012. Agreement rate of rapid urease test, conventional PCR, and scorpion real-time PCR in detecting *Helicobacter pylori* from tonsillar samples of patients with chronic tonsillitis. J. Glob. Infect. Dis. 4: 106–9.
- Nártová, E, Kraus, J, Pavlík, E, Lukeš, P, Katra, R, Plzák, J, Kolářová, L, Sterzl, I, Betka, J, Astl, J. 2014. Presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 271:607–613
- Olivares, D, Gisbert, JP. 2006. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Rev. Esp. Enferm. Dig. 98: 374–86.
- Pavlík, E, Lukes, P, Potuzníková, B, Astl, J, Hrdá, P, Soucek, A, Matucha, P, Doseděl, J, Sterzl, I. 2007. *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). 52: 91–4.
- Pavlik, E, Nartova, E, Astl, J, Drnkova, B, Lukes, P, Potuznikova, B, Katra, R, Kraus, J, Sterzl, I. 2015. Detection of *Helicobacter pylori* and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area. <http://www.sciencepublishinggroup.com> 3: 364.
- Pitkäranta, A, Kolho, K-L, Rautelin, H. 2005. *Helicobacter pylori* in Children Who Are Prone to Upper Respiratory Tract Infections. Arch. Otolaryngol. Neck Surg. 131: 256.
- Portal-Celhay, C, Perez-Perez, GI. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin. Sci. 110: 305–314.
- Qureshi, H, Ahmed, W, Zuberi, SJ, Kazi, J. 1992. Use of CLO test in the detection of *Helicobacter pylori* infection and its correlation with histologic gastritis. J. Pak. Med. Assoc. 42: 292–3.
- Rotimi, O, Cairns, A, Gray, S, Moayyedi, P, Dixon, MF. 2000. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. J. Clin. Pathol. 53: 756–9.
- Sakaguchi, AA, Miura, S, Takeuchi, T, Hokari, R, Mizumori, M, Yoshida, H, Higuchi, H, Mori, M, Kimura, H, Suzuki, H, Ishii, H. 1999. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in *Helicobacter pylori* gastric ulcer. Free Radic. Biol. Med. 27: 781–9.
- Al Sayed, A, Anand, PS, Kamath, KP, Patil, S, Preethanath, RS, Anil, S. 2014. Oral Cavity as an Extragastric Reservoir of *Helicobacter pylori*. ISRN Gastroenterol. 2014: 1–16.



- Shahamat, M, Alavi, M, Watts, JEM, Gonzalez, JM, Sowers, KR, Maeder, DW, Robb, FT. 2004. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3613–9.
- Schiemann, U, Konturek, J, Assert, R, Rembiasz, K, Domschke, W, Konturek, S, Pfeiffer, A. 2002. mRNA expression of EGF receptor ligands in atrophic gastritis before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Med. Sci. Monit.* 8: CR53-8.
- Skinner, LJ, Winter, DC, Curran, AJ, Barnes, C, Kennedy, S, Maguire, AJ, Charles, DA, Timon, CI, Burns, HP. 2001. *Helicobacter pylori* and tonsillectomy. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 26: 505–9.
- Song, Q, Haller, B, Schmid, RM, Adler, G, Bode, G. 1999. *Helicobacter pylori* in dental plaque: a comparison of different PCR primer sets. *Dig. Dis. Sci.* 44: 479–84.
- Stromberg, E, Edebo, A, Svennerholm, AM, 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.
- Tegtmeier, N, Wessler, S, Backert, S. 2011. Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J.* 278: 1190–1202.
- Terio, KA, Munson, L, Marker, L, Aldridge, BM, Solnick, J V. 2005. Comparison of *Helicobacter* spp. in cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with and without gastritis. *J. Clin. Microbiol.* 43: 229–234.
- Testerman, TL, Morris, J. 2014. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J. Gastroenterol.* 20: 12781–808.
- Toros, SZ, Toros, AB, Kaya, KS, Deveci, I, Özel, L, Naiboğlu, B, Habeşoğlu, T, Egeli, E. 2011. A study to detect *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue. *Ear. Nose. Throat J.* 90: E32.
- Unver, S, Kubilay, U, Sezen, OS, Coskuner, T. 2001. Investigation of *Helicobacter pylori* colonization in adenotonsillectomy specimens by means of the CLO test. *Laryngoscope* 111: 2183–6.
- Vaira, D, Holton, J, Menegatti, M, Ricci, C, Gatta, L, Geminiani, A, Miglioli, M. 2000. Review article:invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 Suppl 3: 13–22.
- Vayisoglu, Y, Ozcan, C, Polat, A, Delialioglu, N, Gorur, K. 2008. Does *Helicobacter pylori* play a role in the development of chronic adenotonsillitis? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72: 1497–501.
- Velapatino, B, Balqui, J, Gilman, RH, Bussalleu, A, Quino, W, Finger, SA, Santivanez, L, Herrera, P, Piscocoya, A, Valdivia, J, Cok, J, Berg, DE. 2006. Validation of string test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J. Clin. Microbiol.* 44: 976–980.
- Vilarinho, S, Guimarães, NM, Ferreira, RM, Gomes, B, Wen, X, Vieira, MJ, Carneiro, F, Godinho, T, Figueiredo, C. 2010. *Helicobacter pylori* colonization of the adenotonsillar tissue: fact or fiction? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74: 807–11.
- Yilmaz, M, Kara, CO, Kaleli, I, Demir, M, Tümkaya, F, Büke, AS, Topuz, B. 2004. Are tonsils a reservoir for *Helicobacter pylori* infection in children? *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68: 307–10.

- Yilmaz, T, Ceylan, M, Akyon, Y, Ozcaky, O, Gursel, B. 2006. Helicobacter pylori: A possible association with otitis media with effusion. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* 134: 772–777.
- Zhou, J, Zhang, D, Yang, Y, Zhou, L, Tao, L. 2016. Association between helicobacter pylori infection and carcinoma of the larynx or pharynx. *Head Neck* 38: E2291–E2296.
- Zhuo, X-L, Wang, Y, Zhuo, W-L, Zhang, X-Y. 2008. Possible Association of Helicobacter pylori Infection with Laryngeal Cancer Risk: An Evidence-based Meta-analysis. *Arch. Med. Res.* 39: 625–628.

## 9 Obsah přílohy

Nártová, E., Kraus J., Pavlík E., Lukeš P., Katra, R., Plzák, J., Kolářová L., Šterzl I., Betka J., Astl J.: presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271:607–613 (**IF 1,458**)

Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B., Nártová E. et al.: Detection of *Helicobacter pylori* in oropharyngeal lymphatic tissue with real – time PCR and assessment of its carcinogenic potential, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271:399–405 (**IF 1,458**)

Kraus, J., Nártová E., Pavlík E., Katra, R. et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar hypertrophy in children, *Acta Otolaryngol*, 2014, 134: 88-92 (**IF 0,99**)

Katra, R., Kabelka, Z., Jurovčík M., Hradský, O., Kraus, J., Pavlík, E., Nártová, E. et al.: *Helicobacter pylori* in adenoid hyperplasia and reflux episodes detected by multiple intralunimanl impedance in children, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78: 1243–1249 (**IF 1,447**)

Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B, Plzák J, Nártová E., Doseděl J, Katra R, Sterzl I, Betka J, Astl J.: Comparison of *Helicobacter pylori* genotypes obtained from the oropharynx and stomach of the same individuals - a pilot study, *Prague Med Rep.* 2012;113(3):231-9.