



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Úloha vybraných agens v rozvoji  
maligních procesů v oblasti orofaryngu**

**The role of selected infectious agents in  
development of malignancies in  
oropharyngeal area**

Bakalářská práce

Studijní program: B5345 Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Tereza Malečková

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Emil Pavlík, CSc.

---

Kladno 2020



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

### I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Malečková** Jméno: **Tereza** Osobní číslo: **478110**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

### II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Úloha vybraných infekčních agens v rozvoji maligních procesů v oblasti orofaryngu**

Název bakalářské práce anglicky:

**The role of selected infectious agents in development of malignancies in oropharyngeal area**

Pokyny pro vypracování:

Helicobacter pylori je patogenem gastrointestinálního traktu, v němž působí primárně gastritidu typu B a je prokázaným kofaktorem maligních nádorů v této oblasti. Řada studií prokázala přítomnost Helicobacter pylori v lymfatické tkáni orofaryngu a v nádorových buňkách malignit v této oblasti. Bakterie byla prokázána i u chronických tonsilitid, což otevírá otázku, zda chronická tonsilitida není dlouhodobým rizikovým faktorem pro malignity v této oblasti. Dalším agens prokázaným v této oblasti jsou lidské papilomaviry (HPV), u nichž je prokázán onkogenní účinek v oblasti cervix uteri. Naše studie vychází ze srovnávacího vyšetření stovky materiálů získaných peroperační biopsií nádorů a tkání na klinických pracovištích standardizovanou technikou, které budou následně vyšetřeny izolací DNA s následným testováním pomocí metody polymerázové řetězové reakce na přítomnost Helicobacter pylori a Humánních papilomavirů, s jejich následným genotypovým určením.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Strauss J.H., Strauss E.G., Viruses and Human Disease, Academic Press (Harcourt Incorporated) San Diego/London, 2002, ISBN 0-12-673050-4
- [2] Navrátil L. a kol.: Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory, ed. 2. zcela přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing Praha, 2017, ISBN 978-80-271-0210-5
- [3] Pavlík, E., Nártová, E., Asti, J., Draková, B., Lukeš, P., Potužníková, B., Katra, R., Kraus, J., Sterzl, I., Detection of Helicobacter pylori and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area, American Journal Clinical and Experimental Medicine, 2015, 3(6):364-367 s., ISSN 2330-8125

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**MUDr. Emil Pavlík, CSc.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **23.09.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.  
postav vedoucího katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
postav konzultanta(ky)

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Úloha vybraných agens v rozvoji maligních procesů v oblasti orofaryngu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 28.05.2020

.....  
Tereza Malečková

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří především MUDr. Emilu Pavlíkovi, CSc. za odborné vedení práce, jeho cenné poznámky a připomínky, a v neposlední řadě za čas, ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále bych tímto chtěla poděkovat MUDr. Daniele Obitkové za vstřícnost a ochotu při konzultacích, a zejména pak za pomoc při získání potřebných informací a podkladů. Děkuji také Bc. Viktoriyi Gvozdevě, za psychickou podporu a motivaci při psaní práce.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je zaměřena na výskyt *Helicobacter pylori* a humánních papilomavirů v lymfatické tkáni oblasti orofaryngu a možné patogenní působení těchto agens, včetně onkogenního. Je zde popsána řada zánětlivých onemocnění a malignit, v jejichž patogenezi se mohou tato infekční agens uplatnit. Teoretická část se zabývá příčinami vzniku těchto onemocnění a jejím úkolem je seznámit čtenáře s novými poznatky, které poukazují na přítomnost a možné patogenní působení *Helicobacter pylori* a lidských papilomavirů v dané oblasti.

V praktické části bakalářské práce jsme zjišťovali přítomnost těchto vybraných infekčních agens ve vzorcích pacientů pomocí molekulárně genetických technik a srovnáváme zastoupení bakteriální infekce *Helicobacter pylori* a virové infekce HPV včetně genotypizace u chronických zánětlivých onemocnění (tonsilitis) a nádorových onemocnění (karcinom tonsil a karcinom orofaryngu).

### **Klíčová slova**

*Helicobacter pylori*; lidský papilomavirus; orofarynx; lymfatická tkáň; PCR v reálném čase (real-time); genotypizace.

## **ABSTRACT**

The thesis focuses on the presence of *Helicobacter pylori* and human papillomaviruses in lymphatic areas of oropharyngeal cells and possible pathogenic effects of these agents, including oncogenic. A number of inflammatory diseases and malignancies are described in this thesis, whose pathogenesis may be valuable within the scope of these infection agents.

The theoretical section focuses on the cause of occurrence of these diseases and the aim is to introduce the reader to information that highlights the existence and possible pathogenic effects of *Helicobacter pylori* and human papillomaviruses within the given area.

In the practical section we focused on discovering the presence of these infectious agents. By collecting samples from patients and by using molecular genetic techniques, we compare the presence of the bacterial infection *Helicobacter pylori* and the viral HPV disease, including genotyping of patients with chronic inflammatory diseases (tonsillitis) and cancer-based diseases (tonsils cancer and oropharyngeal cancer).

### **Keywords**

*Helicobacter pylori*; human papillomavirus; oropharynx; lymphoid tissue; real-time PCR; genotyping.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	10
3	Přehled současného stavu.....	11
3.1	Helicobacter pylori.....	11
3.1.1	Charakteristika.....	11
3.1.2	Cytotoxin VacA.....	13
3.1.3	CagA systém.....	18
3.1.4	Waldeyerův lymfatický okruh.....	19
3.2	Humánní papilomaviry.....	22
3.2.1	Charakteristika.....	22
3.2.2	Působení humánních papilomavirů na hostitelské buňky.....	23
3.2.3	HPV v oblasti oropharyngu.....	25
4	Metodika.....	29
4.1	Odběr biologického materiálu.....	29
4.2	Izolace nukleových kyselin.....	29
4.3	Polymerázová řetězová reakce.....	33
4.3.1	End-point PCR.....	33
4.3.2	Real-time PCR.....	34
4.3.3	Reverzní Dot-Blot.....	36
4.4	Postup práce.....	37
4.4.1	Izolace nukleových kyselin.....	37
4.4.2	Real-time PCR test pro Helicobacter pylori.....	40

4.4.3	Genotypizace Helicobacter pylori.....	41
4.4.4	Real-time PCR test pro HPV .....	42
5	Výsledky .....	43
6	Diskuze .....	64
7	Závěr .....	69
8	Seznam použitých zkratk.....	70
9	Seznam použité literatury .....	72
10	Seznam použitých obrázků .....	77
11	Seznam použitých tabulek.....	79



# 1 ÚVOD

Jak je známo, už od počátku lidstva se lidé potýkají s řadou onemocnění. Některá jsou snadno léčitelná, jiná onemocnění vyžadují obtížnější a nákladnější léčbu. V momentě, kdy se objeví pacient s neobvyklými symptomy a lékaři jsou bezradní, nastává problém, který je nutno řešit. *Helicobacter pylori* a humánní papilomaviry (HPV) často způsobují onemocnění, která pro úplnou a efektivní léčbu vyžadují včasnou diagnostiku. Je známo, že HPV infekce často postihuje u žen cervix uteri, kde působí kancerogenně. *Helicobacter pylori* působí na gastrickou mukózu a způsobuje gastritidy, které se mohou rozvinout v řadu malignit. Laická veřejnost však vůbec netuší o existenci těchto infekčních agens, natož pak o tom, že mohou působit i v jiných oblastech těla, kde jejich působení není zcela typické.

Existuje řada studií, které poukazují na přítomnost těchto agens a jejich působení v oblasti orofaryngu. Vzhledem k vlastnostem těchto agens se vyskytly hypotézy, které je nutno objasnit. Jednou z hypotéz je, že *Helicobacter pylori* je přítomen ve Waldeyerově lymfatickém okruhu. Druhou hypotézou je přítomnost HPV v oblasti orofaryngu, zejména pak přítomnost HPV 16, které jsou zřejmě hlavním faktorem působícím malignity v této oblasti. I přes to, že některé studie přítomnost HPV v této oblasti prokázaly, mechanismus jeho působení na buňku v této oblasti je stále nejasný.

Účelem této bakalářské práce je tedy nejen seznámit čtenáře s vybranými infekčními agens a jejich působením na hostitelskou buňku, ale především prokázat jejich přítomnost a určit jednotlivé genotypy vyskytující se v oblasti orofaryngu.

## 2 CÍLE PRÁCE

*Helicobacter pylori* je prokázaným kancerogenním faktorem v oblasti žaludku a duodena, HPV jsou prokázaným kancerogenem v oblasti děložního hrdla. Cílem této bakalářské práce je průkaz *Helicobacter pylori* a HPV v tkáni nádorů a zánětů vyňatých z oblasti orofaryngu a následně jejich genotypizace pomocí technik molekulární biologie, zejména kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (real-time PCR), která k průkazu jednotlivých genotypů využívá fluorescenčně značené sondy. Vybraná agens jsou prokazována konkrétně v konkrémentech odebraných z oblasti tonsil, které jsou součástí Waldeyerova lymfatického okruhu. Očekávaným přínosem této bakalářské práce je včasná diagnostika vybraných infekčních agens u pacientů trpících příznaky onemocnění, vzniklých v důsledku působení těchto agens.

### 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

V této kapitole popisují charakteristiku vybraných infekčních agens *Helicobacter pylori* a lidských papilomavirů (dále jen HPV), malignity jimi způsobené a jejich působení na hostitelské buňky.

Působení *Helicobacter pylori* v oblasti orofaryngu nebylo dosud zcela prokázáno a mechanismus jeho účinku na hostitelskou buňku v této oblasti rovněž nebyl popsán. V kapitole tedy popisují působení *Helicobacter pylori* na gastrointestinální trakt, neboť v této oblasti je patogenita *Helicobacter pylori* zcela prokázána a je znám mechanismus jeho působení na gastrickou a duodenální mukózu a buňky lymfatického systému. Je též popsán mechanismus vzniku řady onemocnění způsobených tímto agens, včetně kancerogeneze (1,2).

#### 3.1 *Helicobacter pylori*

##### 3.1.1 Charakteristika

Poprvé *Helicobacter pylori* identifikovali v roce 1983 Marshall a Warren (2) ve spojitosti s gastrickým epitelem pacientů trpících chronickými gastritidami. Jejich objev měnil zcela pohled na vznik žaludečních vředů byl poměrně překvapivý. Doté doby se mělo za to, že kyselé pH v žaludku neumožňuje bakteriím v této oblasti dlouhodobě přežívat. Marshall s Warrenem toto infekční agens shledali patogenem primárně gastritidy typu B, gastrických a duodenálních vředů, gastrického adenokarcinomu, lymfomu slizničního lymfatického systému (mucosa-associated tissue lymphoma neboli MALT lymphoma) a non-Hogkingova lymfomu v oblasti žaludku. Za svůj objev byli v roce 2005 oceněni Nobelovou cenou za medicínu. Jako výsledek jejich výzkumu klasifikovala Světová zdravotnická organizace (WHO) *Helicobacter*

*pylori* jako karcinogen I. třídy v oblasti gastrointestinálního traktu, zejména tedy žaludku a duodena (1,2).

*Helicobacter pylori* je gram-negativní, spirálovitá, mikroaerofilní bakterie, kolonizující žaludeční sliznici. Je esovitě zahnutý s několika opláštěnými bičíky, které vycházejí z polárních konců bakterie. Díky těmto bičikům je *Helicobacter pylori* vysoce mobilní i v prostředí s vysokou viskozitou, jako je právě žaludeční mukóza. Bičík je složen ze tří částí, které jsou označovány jako bazální tělo, vlákno a hák. Bazálním tělem je bičík připojen k buněčné stěně bakterie. Vlákno je nejvzdálenější část bičíku, tedy část koncová a je tvořena globulárním proteinem zvaným flagellin. Hák je část prostřední a spojuje tedy bazální tělo s vláknem bičíku. Bičíky se dokážou chovat jako vrtule. Otáčejí se proti směru hodinových ručiček, a proto mají schopnost bakterii nejen velice rychle přesunout z jednoho místa na druhé, ale také jí umožňují pohybovat se ve viskózním hlenu (1,2,3).

Dříve se předpokládalo, že přítomnost *Helicobacter pylori* v gastrointestinálním traktu (GIT) není možná, díky kyselému pH žaludečních šťáv. Později se však zjistilo, že díky jeho schopnosti produkovat enzym ureázu, dokáže rozkládat močovinu nacházející se v žaludku, konkrétně v žaludeční šťávě, na oxid uhličitý a amoniak. Díky této reakci si *Helicobacter pylori* zajistí prostředí s pH optimálním, pro jeho přežití, zejména proto, že amoniak neutralizuje kyselinu chlorovodíkovou. V případě, že okolní pH klesne, aktivují se receptory v buněčné membráně *Helicobacter pylori* a ten znovu začne produkovat ureázu. Tato vlastnost je popisována jako acidická aklimatizace (2,3,4).

Kromě toho, že enzym ureáza štěpí močovinu, obsaženou v žaludku, na amoniak a oxid uhličitý, má také toxické účinky na buňky epitelu. Ureáza totiž přispívá k infekci a stimuluje tak imunitní odpověď organismu (3).

*Helicobacter pylori* je specifický svými membránovými komponenty, které hrají důležitou roli při adhezi a kolonizaci gastrické mukózy zejména proto, že jsou prvním faktorem styku s hostitelem. Nejdůležitějšími faktory, způsobující patogenitu *Helicobacter pylori* je cytotoxin VacA a sekreční systém Cag (1,2).

### 3.1.2 Cytotoxin VacA

Cytotoxin VacA (vakualizační cytotoxin A) je jeden z faktorů způsobující virulenci *Helicobacter pylori*. Jedná se o proteinový toxin, vylučovaný autotransportním mechanismem do extracelulárního prostoru. Svými účinky je VacA zcela odlišný od toxinů jiných bakterií. Většina bakteriálních toxinů pronikají do hostitelské buňky a působí zde změny prováděním enzymatické aktivity v intracelulárním prostoru. Jiné toxiny vytvářejí póry v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. U VacA toxinu nebyla prokázána žádná enzymatická aktivita, přesto stimuluje tvorbu vakuol. Tato schopnost ale není jediným mechanismem způsobujícím virulenci. VacA toxin je zodpovědný za celou řadu transformací gastrických epitelálních buněk, kde obecně způsobuje nejen změny v nitrobuněčném prostoru, ale působí také na permeabilitu mitochondriální membrány a aktivuje signální transdukční mechanismy, čímž přispívá ke kolonizaci buněk gastrické mukózy a tím i ke vzniku peptidických vředů či maligních onemocnění. Tento cytotoxin také inhibuje aktivaci a proliferaci T-lymfocytů a dalších imunitních buněk. VacA toxin byl díky schopnosti stimulovat vakuolizaci zařazen mezi tzv. pore-forming toxiny neboli bakteriální toxiny tvořící póry v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky (2,5).

Gen *vacA* nese protoxin, který se musí nejprve aktivovat, tzv. maturovat, aby se stal extracelulárně aktivním proteinem. Tento proces probíhá v několika krocích. Nejdříve dochází k proteolytickému štěpení N-terminální signální sekvence (amino-terminální signální sekvence) a C-terminální domény (carboxyl-terminální doména) protoxinu o velikosti 140 kDa, k čemuž pravděpodobně dochází při transportu protoxinu cytoplazmatickou membránou a do periplazmatického prostoru. Tímto štěpením vzniká sekretovaný protein o velikosti 88 kDa, složený ze dvou podjednotek, kterými jsou domény p33 a p55. Řada studií dokázala, že jednotka p55 hraje významnou roli ve vazbě VacA toxinu na hostitelskou buňku. Existuje předpoklad, že doména p33 obsahuje silně hydrofobní oblast. Tato oblast se nachází blízko N-konce a je významná pro tvorbu membránových kanálů a dalších změn hostitelských buněk (2).

Všechny kmeny *Helicobacter pylori* mají kopii genu *VacA*, ale výrazně se odlišují v hladinách vakuolizující toxinové aktivity. Některé kmeny *Helicobacter pylori* nejsou schopny exprimovat funkčně aktivní protein v důsledku genových mutací, jako je například delece, inserce nebo interní duplikace. U řady kmenů, které exprimují *VacA*, dochází k rozdílné transkripci *vacA* genu nebo k rozdílné sekreci VacA toxinu. Různé kmeny *Helicobacter pylori* obsahují různé alely *vacA*, které jsou spojeny s rozdílnou vakuolizující toxickou aktivitou (2).

Oblast *vacA*, která vykazuje maximální sekvenční rozmanitost je oblast umístěna ve středu genu, označovaná jako m-oblast. Tato oblast kóduje část domény p55. V m-oblasti jsou rozlišovány dvě alelické rodiny, označované jako m1 a m2. Další významná oblast vykazující sekvenční rozmanitost je takzvaná s-oblast. Ta je umístěna na 5'konci *vacA* genu a zahrnuje signální sekvenci VacA na N-konci a N-konec zpracovaného aktivovaného toxinu. V s-oblasti jsou

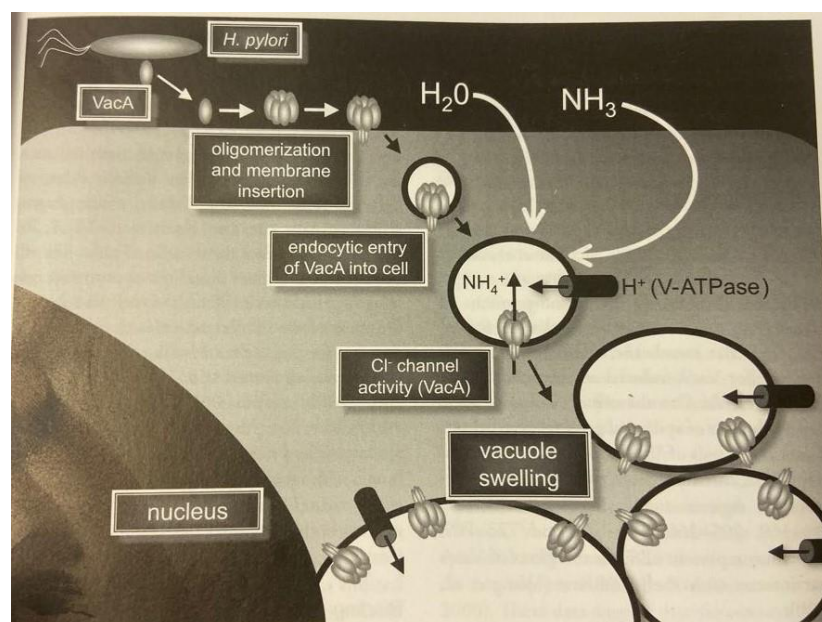
rozpoznávají dvě alelické rodiny, které jsou označovány jako s1 a s2. Alelický typ s1 se poté dále rozděluje na subtypy s1a, s1b, a s1c (2).

Genotyp *vacA* je hlavním faktorem určující vakuolizační aktivitu. Kmeny *Helicobacter pylori*, které obsahují alelu s2 trvale nevyvolávají vakuolizaci hostitelských buněk. Proteiny VacA, které obsahují signální sekvenci s2, podléhají štěpení N-terminálního signálního peptidu na jiném místě než proteiny VacA se signální sekvencí s1 a v důsledku toho si zachovají na N-konci hydrofilní peptid, který blokuje toxinem vyvolanou vakuolizaci buňky. Existuje řada různých kombinací těchto alel, a tedy i řada genotypů *Helicobacter pylori*, přičemž formy *vacA* s2/m1 jsou poměrně vzácné (2).

VacA toxin je schopný intoxikovat celou škálu buněk, zejména epiteliální buňky gastrické mukózy a řadu buněk imunitního systému. Díky VacA toxinu dokáže *Helicobacter pylori* v těchto buňkách přežít. V důsledku působení VacA toxinu prochází buňky řadou různých změn. Intraluminální pH vakuol je kyselé a vakuoly jsou endocyticky aktivní (2).

Před tím, než vnikne VacA do buňky se musí oligomerizovat a až poté dochází k přichycení toxinu na buněčnou membránu. Oligomerizovaný VacA pronikne endocytózou do buňky, kde vzniká velké množství vezikul. VacA vytvoří v membránách těchto vezikul, které se označují jako pozdní endocytické kompartmenty, anion-selektivní kanály, které mají charakter jak pozdních endosomů, tak časných lyzozomů. Tyto anion-selektivní kanály usnadňují transport chloridových iontů, což vede ke zvýšení jejich intraluminální koncentrace. Za účelem vykompenzovat zvýšenou koncentraci chloridových iontů je aktivována vakuolární ATPáza (V-ATP), která zvyšuje příjem protonů do vytvořených kompartmentů. Zvýšený příjem protonů do intraluminálního prostoru snižuje intraluminální pH. Membrána prostřednictvím

anion-selektivních kanálů propouští slabé báze, konkrétně amoniak, který se uvnitř kompartmentů protonizuje a zachytí. Nakonec vzniká osmotický otok, který je důsledkem vakuolizace kompartmentů, která pravděpodobně narušuje dráhy výměny proteinů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím hostitelské buňky, a tím narušuje její funkci. Celý mechanismus vakuolizace způsobený VacA toxinem, je znázorněn na obrázku (Obr. 1) (2,6).



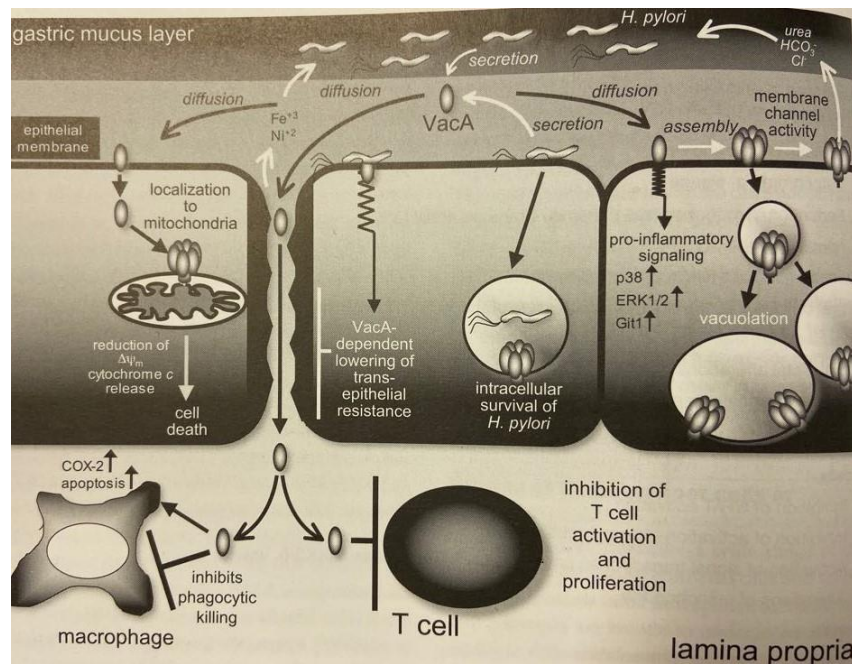
**Obrázek 1** Schéma buněčné vakuolizace indukovaná cytotoxinem VacA (2)

Cytotoxin VacA působí nejen uvnitř buňky, ale i na jejím buněčném povrchu. Jeho vazba na povrch buňky je prvním místem styku s hostitelskou buňkou při intoxikaci. Ve vodě rozpustné oligomerní formy VacA toxinu se před stykem s buňkou aktivují buď alkalicky, nebo acidicky. Takto aktivované formy VacA toxinu vykazují vyšší afinitu k buněčnému povrchu než formy inaktivované (2).



Cytotoxin VacA také hraje roli při lokalizaci v mitochondriích, kde působí jako faktor vyvolávající apoptózu buňky. V důsledku působení toxinu dochází k uvolňování cytochromu c a k narušení elektrochemického potenciálu na membráně mitochondrie. Takovéto změny vedou k poklesu ATP v hostitelské buňce a ke znesnadnění průběhu buněčného cyklu. Snížení ATP v buňce má za následek např. poškození některých metabolických drah a také způsobuje rezistenci buněk vůči oxidačnímu stresu (2).

VacA toxin také způsobuje mnohočetné změny v T-lymfocytech, makrofázích, žírných buňkách, eozinofilech a neutrofilech. V T-lymfocytech snižuje povrchovou expresi receptorů interleukinů dva (IL-2), čímž je inhibuje. Inhibice jejich aktivace a proliferace se uskuteční tak, že VacA toxin inhibuje nukleární faktor těchto buněk, což je transkripční faktor, který působí jako regulátor imunitní odpovědi a je důležitý pro optimální aktivaci T-lymfocytů. V infikovaných makrofázích způsobuje VacA tvorbu velkých vezikulárních útvarů, které se nazývají megazomy. Tyto vezikulární útvary vznikají stejnorodým splynutím jednotlivých fagozómů. VacA toxin tímto způsobem vyvolává apoptózu makrofágů. Při napadení žírné buňky způsobuje VacA změnu koncentrace intracelulárních vápenatých iontů a exocytózu sekrečních granul. Při kontaktu VacA toxinu s membránovými receptory žírných buněk dojde k aktivaci transdukčních mechanismů, aniž by se vytvořily anion-selektivní kanály. U eozinofilů se intoxikace VacA toxinem projeví jako snížená exprese chemokinů. Všechny popsané mechanismy jsou znázorněny na obrázku 2 (Obr. 2) (2).



Obrázek 2 Působení VacA toxinu na buňky gastrické mukózy a imunitní buňky (2)

### 3.1.3 CagA systém

CagA gen (cytotoxin associated gene A) vyvolává vysokou produkci protizánětlivých cytokinů v gastrické mukóze. Je prokázáno, že právě přítomnost CagA genu je jedním z hlavních faktorů vyvolávající peptidické maligní onemocnění žaludku, zejména adenokarcinom (3).

Prvním krokem průniku bakterie do epiteliální buňky hostitele je její připojení na cytoplazmu. Do cytoplazmy poté vniká genový produkt CagA prostřednictvím sekrečního systému IV, který kromě Cag systému zahrnuje řadu dalších systémů jako je například ComB nebo systém TFS3. Nejdůležitějším systémem je však Cag systém, hlavně proto, že je rizikovým faktorem vzniku řady onemocnění způsobených *Helicobacter pylori*. Po lokalizaci membrány dojde k fosforylaci tyrosinu enzymem tyrosinofosfatázou a dochází k translokaci CagA, který zde interaguje s řadou proteinů, účastnících se buněčné signalizace.

Buněčná signalizace reguluje proliferaci a diferenciaci buněk. Regulační mechanismy buněčné signalizace a integrity epiteliální buňky jsou aktivitou CagA narušeny a dochází k morfologickým změnám hostitelské buňky, zejména tím, že narušuje integritu epiteliální buňky a regulační mechanismy buněčné proliferace a diferenciaci. Působením CagA proteinu tedy dochází k buněčné dysfunkci, která má za následek řadu genetických mutací a následně maligní transformaci (6).

### 3.1.4 Waldeyerův lymfatický okruh

Jak vyplývá z výše uvedeného textu, *Helicobacter pylori* postihuje nejen epitelové buňky gastrické mukózy, ale i lymfatické žlázy, kde pravděpodobně působí obdobným mechanismem, jako na buňky žaludeční sliznice. V této podkapitole popisují části Waldeyerova lymfatického okruhu, který je složen z lymfatické tkáně orofaryngu a nasofaryngu a malignity spojené s touto oblastí (7).

Hlavní části Waldeyerova lymfatického okruhu:

- Tonsilla lingualis (tj. jazyková mandle)
- Tonsilla palatina (tj. patrová mandle)
- Tonsilla tubaria (tj. tubární mandle při ústí Eustachovy trubice)
- Tonsilla pharyngea (tj. nosní mandle) (8)

Lymfatická tkáň Waldeyerova lymfatického okruhu je situována v počátku trávicího a dýchacího traktu. Je řazena do lymfatické tkáně tvořené mukózou, která je označována jako MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). Vzhledem k lokalizaci Waldeyerova lymfatického okruhu je zřejmé, že tonsily tvoří první obranou linii organismu při styku s exogenním antigenem (9).

Tonsily jsou tvořeny tzv. kryptami, což jsou vchlípeniny tvořené povrchovým epitelem. V povrchovém epitelu se nacházejí antigen prezentující buňky. V kryptách jsou uloženy mikroporézní buňky označované jako M-buňky. Funkcí těchto buněk je zajistit transport antigenu, který je poté exprimován pomocným T-lymfocytům (Th-lymfocyty) a B-lymfocytům prostřednictvím antigen prezentujících buněk. B-lymfocyty se nacházejí v germinálních centrech lymfatických folikulů. T-lymfocyty jsou roztroušené v retikulárním vazivu, označovaném jako stroma, které je situováno okolo lymfatických folikulů (8, 10).

Nejčastějšími malignitami postihující Waldeyerův lymfatický okruh jsou karcinomy, které do této oblasti metastazují z okolních tkání. Druhou méně častou malignitou této oblasti jsou non-Hogkingovy lymfomy (NHL), kdy se jedná především o NK/T-buněčný lymfom nosálního typu a o velký difúzní B-buněčný lymfom, které vznikají v důsledku morfologických změn lymfatických buněk. Mohou zde vzniknout také lymfomy extranodální mezí zóny MALT, které se nejčastěji objevují jako následek chronického zánětu nebo autoimunitního onemocnění (7, 11).

Difúzní velký B-buněčný lymfom (DLBCL) je nejběžnějším podtypem NHL a jeho průběh je velmi agresivní. DLBCL vzniká ze zralých B-lymfocytů genovými mutacemi v určitých stádiích proliferace. Výsledkem těchto mutací jsou maligní transformace. Rozlišujeme několik typů DLBCL v závislosti na typu genové mutace a stádiu proliferace (12).

NK/T-lymfom nosního typu (NKTCL) vykazuje také velmi agresivní průběh, stejně jako DLBCL, ale vyskytuje se jen ojediněle. Důsledkem NKTCL dochází k rychlé destrukci v oblasti nosu a střední obličejové části. V minulosti bylo toto onemocnění označováno pojmem „polymorfní retikulosa“. Později se ukázalo, že proliferující buňky vykazují imunoreaktivitu s polyklonálními protilátkami

proti T-lymfocytům. Proto onemocnění dostalo název „nasální T-lymfom“. Krátce nato byla objevena imunoreaktivita nádorových buněk s markerem CD56, který je typický pro NK-buňky (natural killer cells). Mechanismus, kterým dochází k tomuto malignímu onemocnění nebyl však dosud zcela objasněn (13).

Studie z roku 2013 uvádí, že 90 % pacientů s MALT lymfomy je infikováno *Helicobacter pylori*. Ve fyziologické žaludeční sliznici se lymfatické folikuly nevyskytují. V souvislosti s gastrointestinálním traktem se lymfatické folikuly vyskytují zejména v tonsilách a Peyerových plátech tenkého střeva, mohou se však objevit na žaludeční sliznici po zánětlivých procesech. V roce 1993 bylo prokázáno, že gastritida způsobená *Helicobacter pylori* je hlavním faktorem vzniku MALT na gastrické mukóze. U řady pacientů infikovaných *Helicobacter pylori* byla zjištěna přítomnost lymfatických folikulů v biopsiích žaludku. U neinfikovaných pacientů se MALT na žaludeční sliznici neobjevil a nebyly zdokumentovány lymfatické folikuly. Tato studie také prokázala, že rok po eradikaci *Helicobacter pylori* se snížil počet lymfatických folikulů. Dalšími studiemi bylo zjištěno, že pouze vybrané kmeny *Helicobacter pylori* jsou schopny stimulovat proliferaci neoplastických B-lymfocytů. Pro stimulaci těchto B-lymfocytů bakterií je však nutná přítomnost pomocných T-lymfocytů. Kultivací lymfocytů z MALT lymfomu bylo zjištěno, že po odstranění T-lymfocytů z kultury se proliferace neoplastických B-lymfocytů výrazně snížila. Tato skutečnost by mohla poukazovat na interakce mezi *Helicobacter pylori* a pomocnými T-lymfocyty, které jsou pravděpodobně pro vznik MALT lymfomů nezbytné (14,15).

Non-Hogkingovy lymfomy včetně MALT lymfomů vznikají nejen v gastrické mukóze, ale také ve Waldeyerově lymfatickém okruhu. Jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních faktorů vzniku tohoto onemocnění je *Helicobacter pylori*. V gastrointestinálním traktu je *Helicobacter pylori* primárním faktorem

vzniku řady onemocnění, která jsou v terminální fázi důsledkem maligních transformací. Vzhledem ke skutečnosti, že *Helicobacter pylori* je schopen transformovat buňky lymfatické tkáně zejména v souvislosti s lymfatickými folikuly, je možné se domnívat, že existuje jistá analogie mezi působením tohoto agens na gastickou mukózu a mezi působením na lymfatickou tkáň v oblasti orofaryngu (1,2,8,10,14,15).

## **3.2 Humánní papilomaviry**

### **3.2.1 Charakteristika**

Humánní papilomaviry (dále jen HPV) patří do čeledi Papovaviridae. Napadají zejména kůži a sliznice po celém těle. Existuje řada typů HPV. Některé na kůži a na sliznici genitálu vytvářejí různé typy bradavic a v oblasti hrtanu a dutiny ústní tvoří papilomy na sliznicích. Tyto bradavice jsou ve většině případů benigní, ale mohou malignizovat. K nákaze těmito typy HPV dochází zejména u dětí, a to přímým kontaktem. Vybrané HPV, což jsou nejčastěji typy 16, 18, 6 a 11, působí u mužů karcinomy penisu a u žen karcinomy cervixu uteri a dělohy. Infekce HPV v dospělosti se přenáší zejména pohlavním stykem, existuje ale také možnost přenosu infekce z matky na dítě. HPV 16 způsobuje karcinomy v oblasti orofaryngu. Mechanismus infekce HPV 16, jehož následkem je vznik orofaryngeálního karcinomu však není zcela znám (4, 16).

HPV jsou malé, neobalené viry, jejichž nukleokapsida má tvar dvacetistěnu. Obsahují kruhovou, dvouvláknovou DNA (deoxyribonukleová kyselina), která je složena z přibližně osmi tisíc párů bází. DNA je uložena v proteinové kapsidě, která slouží jako ochrana viru před okolními vlivy, zejména nukleázami, a zajišťuje adsorpci viru na povrch hostitelské buňky. Kapsida HPV se skládá ze sedmdesáti dvou pentamerických kapsomer (4,17,18).

DNA genom HPV kóduje celkem osm genů, z nichž šest proteinů je zodpovědných za replikaci viru a dva mají transformační vlastnosti. Tyto dva geny jsou označovány jako gen E6 a gen E7 a jsou charakteristické svou pleiotropní funkcí. Regulují například buněčný cyklus, chromozomální stabilitu nebo transmembránovou signalizaci. Dokážou také transformovat buněčné linie a imortalizovat primární buněčnou linii. Geny E6 a E7 jsou tedy hlavními faktory vzniku maligních transformací (19, 20).

### **3.2.2 Působení humánních papilomavirů na hostitelské buňky**

Nejsnadnějším místem napadení je pro HPV oblast, kde dochází k přechodu dlaždicového epitelu v cylindrický. Tato oblast se nachází především na cervixu uteri nebo v oblasti orofaryngu. HPV napadají receptory mitoticky aktivních buněk, které se nachází na bazální vrstvě epitelu. K adhezi HPV na receptory dochází díky povrchovému proteinu L1. Následně dochází k porušení cytoplazmatické membrány a k průniku virionu do buňky. Po průniku virů do buňky jsou viry zachyceny transportními váčky, které se později stávají součástí endozomů. Povrchový protein L2 umožní HPV částečnou degradaci membrány endozomů a viry tak pronikají do cytosolu buňky. V buňkách dochází ke ztrátě kapsidy a virová DNA pronikne do jádra hostitelské buňky. Zde je zahájeno množení virové DNA. HPV dokáže korigovat kontrolní mechanismy buněčného dělení. Takto si vytvoří podmínky pro svůj vlastní reprodukční cyklus (21,22).

Jak již bylo zmíněno genom HPV kóduje osm genů proteinové povahy, které jsou označeny E1 až E8. Gen E1 hraje významnou roli v zahájení replikace viru. E2 protein je při transkripci viru důležitý, pro její regulaci. Protein E3 je sice součástí virové DNA, ale jeho význam dosud nebyl objasněn. Funkce proteinu E4 je uvolnění HPV infekce v podobě virionu do buňky. Gen E5, je onkogen, který slouží jako ochrana HPV proti cytotoxickým lymfocytům, čímž znesnadní

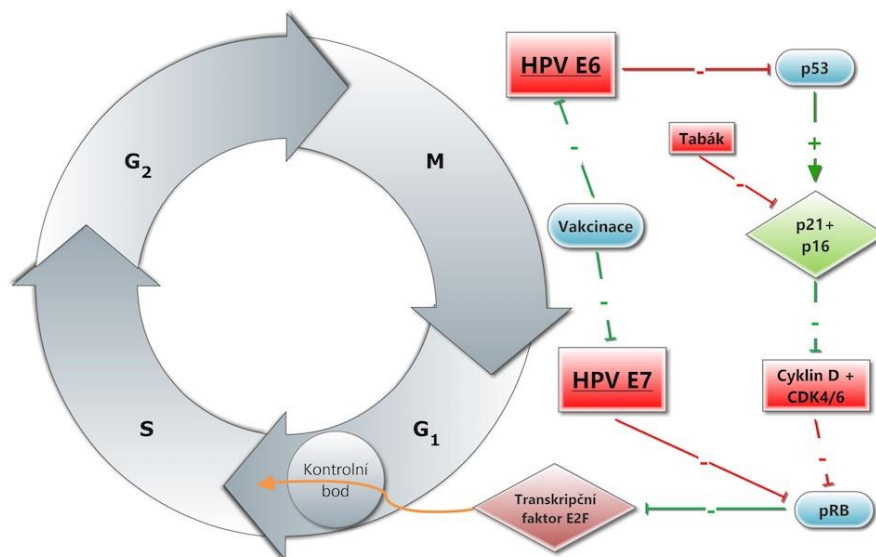
imunitní odpověď organismu. Geny E6 a E7 mají transformační vlastnosti a jejich působení na buňku bude tedy popsáno podrobněji. Gen E8 hraje roli při latentní virové infekci v bazálních epitelových buňkách (19, 20, 23, 24).

Geny E6 a E7 zakódované ve virové DNA jsou schopné interagovat s tumorovými supresory p53 a pRB (protein retinoblastomu), které regulují buněčný cyklus. Gen E6 podporuje buněčnou proliferaci tvorbou trimerního komplexu, a tím stimuluje degradaci supresoru p53. Trimerní komplex je složen z genu E6, tumorového supresoru p53 a buněčného ubikvitinového enzymu E6-AP (E6-associated protein). Degradace supresoru p53, vyvolaná genem E6, ovlivňuje řadu jeho biologických funkcí, jako jsou například regulační mechanismy ovlivňující vývoj buněčného cyklu, což má za následek nádorovou transformaci buněk a tím i zvýšenou proliferaci nádorových buněk. Gen E6 však také vykazuje onkogenní aktivity, které nemají se supresorem p53 žádnou souvislost (19,20).

Geny E7, jsou onkogeny u vysokorizikových HPV. Do této skupiny jsou zařazovány HPV 16 a 18. Vysokorizikové HPV mají mnohem vyšší afinitu k pRB než nízkorizikové HPV, za které jsou považovány HPV 6 a 11. Je známo, že se v buněčném cyklu uplatňuje řada kontrolních bodů. Celý tento proces je řízen cykliny a cyklin-dependetními kinázami (CDK). Důležitým faktorem je protein p16, který reguluje přechod buňky v buněčném cyklu z G1 do S fáze. G1/S je hlavním kontrolním bodem buněčného cyklu a jeho funkcí je uvést buňku do fáze G0. V této fázi se buňka nepřipravuje na dělení. Protein p16 inhibuje CDK4/6, čímž jí zabrání v reakci s cyklinem D1, a tím dochází k zastavení buněčného cyklu. Vlivem HPV onkogenů však dochází k větší expresi cyklinu D1, který s CDK4/6 začne interagovat a vznikají komplexy, které fosforylují pRB. Protein Rb obsahuje tzv. kapesní domény, což je oblast, na kterou se váže gen E7. Tyto kapesní domény proteinu RB jsou nezbytné pro jeho funkci nádorového supresoru. Jednou z nejdůležitějších funkcí pRB je vázat transkripční faktory



z rodiny E2F a potlačit expresi genů pro replikační enzymy. V momentě, kdy dojde k přerušení vazby pRB a faktorů E2F vlivem genu E7, dojde k uvolnění faktorů E2F v jejich transkripčně aktivních formách a vzniká komplex genu E7 a proteinu RB. Vlivem transkripčně aktivních E2F dochází ke stimulaci transkripce a buněčného dělení. Předpokládá se, že vznik komplexu E7-RB protein vede k buněčné transformaci, která má za následek narušení fyziologických funkcí tumorových supresorů a vznik nádorových onemocnění. Mechanismus účinku E6 a E7 onkoproteinů je znázorněn na obrázku 3 (19,20, 24).



**Obrázek 3** Schéma mechanismu působení E6 a E7 na buněčný cyklus (24)

### 3.2.3 HPV v oblasti oropharyngu

Orofaryngeální spinocelulární karcinom (OPSCC) se řadí mezi nejčastější karcinomy hlavy a krku (HNSCC). Dříve se za hlavní faktor vzniku orofaryngeálního karcinomu považoval tabák a alkohol, a to zejména u populace nad šedesát let. Existují však studie, které prokazují výskyt orofaryngeálního

karcinomu u mladých nekuřáků, kteří se vyhýbají alkoholu. U dvou párů bez abusu kouření a alkoholu, byla z tonsilárního karcinomu vyzolována DNA HPV 16. Byly testovány vzorky ze všech míst hlavy a krku. Tonsilární karcinom však představoval nejvyšší prevalenci HPV 16. Tato skutečnost zřejmě poukazuje na vyšší afinitu HPV 16 k epitelu tonsil. Není zcela zřejmé, proč se karcinomy orofaryngu vyskytují především u mladých lidí. Jednou z možností vysvětlení tohoto jevu u mladých jedinců je větší zranitelnost epitelu mandlí vůči HPV, stejně jako je cervix uteri zranitelnější u mladých dívek než u starších žen. Dalším vysvětlením je však také sexuální chování této skupiny. U mladých lidí často dochází ke střídání sexuálních partnerů a riziko nákazy HPV infekcí orálně genitální cestou se tak značně zvyšuje (20, 25).

Jak již bylo zmíněno, přesný mechanismus vzniku orofaryngeálního karcinomu není dosud zcela objasněn a je tedy nutné provést ještě celou řadu studií, aby došlo k jeho objasnění. Předpokládá se, že mechanismus, jakým je HPV 16 schopen vyvolat malignitu v oblasti orofaryngu je obdobný jako při vzniku maligních onemocnění cervixu uteri. Studie zabývající se působením HPV 16 na epitelální buňky tonsil prokázala, že i při vzniku tonsilárního karcinomu jsou hlavními faktory onkogenu E6 a E7. Protein E6 vyvolal degradaci tumorového supresoru p53, a tím snížil schopnost apoptózy buněk infikovaných HPV. Onkoprotein E7 degradoval pRB, což mělo za následek ztrátu jeho funkce tumorového supresoru. Znemožněním pRB inhibovat buněčný cyklus došlo k neregulované proliferaci buněk. I přesto, že zvýšená exprese onkogenů E6 a E7 je nezbytná pro maligní transformaci a zvýšenou proliferaci buněk, není dosud zcela jasné, jak mohou jiné geny reagovat s těmito onkogeny a transformovat tak infikované buňky do stavu, kdy se stávají nesmrtelnými (20).

Začleněním HPV viru do genomu hostitelské buňky také dochází k nadměrné expresi p16, která je ukazatelem špatně diferencovaného

a pokročilého orofaryngeálního karcinomu. Bylo prokázáno, že p16 je biomarkerem pro radiosenzitivitu a chemosenzitivitu karcinomu (20).

Studie z roku 2014 uvádí, že HPV infekce u orofaryngeálního karcinomu byla pomocí molekulárních technik, kterými jsou PCR a in situ hybridizace, zjištěna již v letech 1990 až 2000. Tento objev přispěl nejen k vyšší úrovni terapie, ale také ke zlepšení primární prevence (25).

I přes to, že od 80. let se výskyt OPSCC zapříčiněný konzumací alkoholu a cigaret stále snižuje díky lepší životosprávě a kondici mladší populace, byl v posledních desetiletích zaznamenán nárůst počtu pacientů s OPSCC, který je způsoben infekcí HPV. V současné době jsou tedy pacienti s OPSCC v lepší celkové zdravotní kondici než pacient, u kterého byl OPSCC diagnostikován v důsledku abusu alkoholu a cigaret. Při absenci těchto klasických rizikových faktorů se tedy za hlavní příčinu OPSCC považuje kombinace genetických faktorů, HPV infekce a rizikové faktory chování. Pokud je však OPSCC u HPV pozitivních pacientů diagnostikován včas, jeho prognóza bývá často příznivější než u HPV negativních pacientů trpících touto chorobou. HPV pozitivních pacientů s diagnózou OPSCC však stále přibývá a OPSCC se tedy stává značným problémem populace. Hlavně z toho důvodu, že většina HPV infekcí probíhá asymptomaticky, HPV pozitivní pacient není schopen infekci odhalit a vyhledat lékařskou pomoc (26).

Vzhledem k závažnosti onemocnění indukovaných HPV a vzrůstajícímu počtu nakažených jedinců, byla vyvinuta vakcína. Vakcinace proti HPV má nejvyšší účinek u dívek, a to zejména před zahájením jejich sexuálního života. V počátcích vakcinace proti HPV se předpokládalo, že prevence HPV infekce je důležitá hlavně u dívek a žen, právě proto, že jsou díky cervixu uteri rizikovou skupinou. V současné době se však provádí vakcinace i u chlapců a mužů.

Hlavním důvodem je fakt, že muži jsou nejen přenašeči této infekce, ale může u nich také dojít k rozvoji řady onemocnění způsobených tímto agens (27).

Dnes je na trhu dostupná bivalentní vakcína Cervarix, která chrání proti vysokorizikovým HPV 16 a 18 a je plně hrazená pojišťovnou. Další vakcínou je Gardasil, dříve označována jako Silgard, která chrání proti HPV 16, 18, 6 a 11 a je tedy kvadrivalentní. Novinkou na trhu je vakcína Gardasil 9, která chrání proti devíti typům HPV, kterými jsou nízkorizikové HPV 6 a 11 a vysokorizikové HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58. Přesto, že vakcíny Gardasil a Gardasil 9 slouží jako ochrana proti více typům HPV než Cervarix, nejsou plně hrazeny pojišťovnami a zájemce si musí na tyto vakcíny doplatit (27, 28).

## 4 METODIKA

### 4.1 Odběr biologického materiálu

Vzorky vyšetřované v rámci této studie pocházejí od pacientů ORL klinik dvou velkých pražských nemocnic. Vzorky byly odebrány za sterilních podmínek během operací nádorů tonsil a dalších nádorů z oblasti orofaryngu (nádorová tkáň) a při tonsilektomiích pro chronickou tonsilitis. Kontrolní skupinu vzorků tvoří odběry slin plus výtěry z orofaryngu provedené pacientům ošetřovaným pro onemocnění uší s jejich souhlasem. Vzorky biologického materiálu byly odebrány do komerčního stabilizačního transportního média Remel-M4RT. Poté byly zkumavky obsahující tyto vzorky řádně označeny identifikačními údaji pacienta a odeslány do Sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Zde byla prováděna analýza těchto vzorků včetně genotypizace *Helicobacter pylori* a HPV. K vlastní analýze bylo použito několik metod a technik, které budou blíže popsány v textu níže.

### 4.2 Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA je proces čištění DNA fyzikálními nebo chemickými metodami. Jedná se o proces, kdy dochází k oddělení DNA od buněčných membrán, RNA, proteinů a řady dalších buněčných složek. Cílem izolace DNA je nejen její dostatečné množství, ale zejména její čistota. Vyizolovaná DNA musí splňovat řadu kritérií, která jsou klíčová pro další analýzu. Izolaci DNA lze provést pomocí ručních metod nebo plně automatizovanými metodami pomocí komerčně dostupných souprav a analyzátorů (29).

Existuje řada technik, kterými lze DNA izolovat. Výběr metody závisí na požadovaném množství, které je nutno získat pro další analýzu, a také na požadované čistotě, od které se odvíjí zvolený postup extrakce a purifikace. Metody extrakce nukleových kyselin lze rozdělit do tří skupin:

- Metody založené na anorganické extrakci (vysolování)
- Metody založené na organické extrakci (fenol-chloroformová reakce)
- Metody založené na adsorpci na pevný podklad (silikagelové membrány) (29)

Vysolování je metodou založenou na anorganické extrakci. Principem této metody je přidání ribonukleázy po inkubaci biologického materiálu s proteinázou K. Tím dojde k degradaci molekul RNA. Následně je přidán roztok vysoce koncentrovaného chloridu sodného (6 mol/l), díky čemuž dojde k vysolení bílkovin přítomných v roztoku. Centrifugací dojde k oddělení bílkovin od supernatantu, v němž je přítomná DNA. Ta je následně ze supernatantu vysrážena. Mezi metody založené na organické extrakci DNA patří fenol-chloroformové a etanolové extrakce a izopropanolové precipitace. Těmito metodami je možno získat velké množství vysoce čisté DNA. Nevýhodou této extrakce je práce s organickými rozpouštědly, pracnost a časová náročnost. Principem metod založených na adsorpci DNA na pevný podklad je schopnost adsorpce nukleových kyselin v přítomnosti chaotropní soli, zejména guanidinu, na silikagely. Tato sůl má schopnost zvýšit rozpustnost proteinů, a tím je oddělit od nukleové kyseliny. DNA tak získává schopnost adsorpce na silikagel. Dalším krokem je promývání, které slouží pro odstranění proteinů a dalších kontaminantů. Silikagel je umístěn v plastové kolonce a obvykle má tvar prstence, kde je nukleová kyselina zachycována. Silikagel je také používán ve formě mikročásteček s kovovým jádrem, kde tvoří jejich povrch. Během extrakce DNA jsou mikročástečky přidány do lyzační směsi. Nukleové kyseliny adsorbují

na jejich povrch a vznikají komplexy, které lze následně oddělit pomocí silného magnetu. (29,30)

Jeho vlivem dojde k přesunutí komplexů, nukleová kyselina-mikročástice, ke stěně extrakční zkumavky. Balastní látky jsou následně ze zkumavky odpipetovány (29,30). Alternativně existují systémy používající adsorpci na skleněné mikropartikule.

Při izolaci RNA je třeba si uvědomit, že DNA není tak náchylná na degradaci enzymy jako RNA. RNázy jsou přítomné v prostředí, proto je tedy třeba přidávat do roztoku inhibitory RNáz, aby nedošlo k degradaci RNA. Při extrakci RNA se používají guanidinové soli, zejména díky jejich schopnosti působení RNáz inhibovat. Pro skladování RNA je vhodné ji pomocí reverzní transkripce převést do cDNA, která je stabilnější (30).

V letech 1997 až 1998 byl vyvinut automatizovaný systém přípravy vzorků AMPLIPREP®. Tato technologie izolace nukleových kyselin spočívá v zachycení jednořetězcové nukleové kyseliny z lyzačního roztoku. Zachycení z lyzačního roztoku zajišťují hybridizační sondy. Celý proces začíná přenesením vzorku do zkumavky, která obsahuje lyzační roztok. Buňky bakterií či virionů jsou lyzovány při teplotě 60°C. Poté dochází k uvolnění nukleové kyseliny, ke které je následně přidána biotinylovaná hybridizační sonda. Následuje proces hybridizace, která též probíhá při teplotě 60°C. V případě dvouvláknové DNA dochází nejprve k denaturaci na jednovláknovou DNA a až poté k jejímu uvolnění. Produktem hybridizace jsou biotinylované komplexy sonda-nukleová kyselina. Po dokončení hybridizace jsou přidány kovové mikropartikule, které mají na svém povrchu navázaný streptavidin. Ten zachycuje biotinylované hybridy. Dalším krokem je promývání. Elektromagnet drží mikropartikule s navázanými hybridy u stěny zkumavky. Dochází tak pouze k odmytí

balastu, případně přítomných inhibitorů polymerázy. Po dokončení promývacího procesu je do zkumavky přidán diluční roztok. Následuje tepelná denaturace, při které dojde k degradaci vodíkových můstků a nukleová kyselina je uvolněna ze sondy. Posledním krokem je přenesení získané nukleové kyseliny do čisté zkumavky. Nyní je nukleová kyselina připravena k amplifikaci. Schéma automatizované izolace nukleových kyselin je znázorněno na obr. 4 (31).



**Obrázek 4** Schéma automatizované izolace (31)

Pro minimalizaci rizika kontaminace jsou zkumavky na vstupu i výstupu opatřeny uzávěrem se závitem. Veškerý použitý materiál je uzavřen v jednorázovém plastovém kontejneru. Dalším opatřením jsou špičky mikropipety, které obsahují filtr a zabraňují průniku vzorku do nežádoucích oblastí. Jehla pro dávkování reagensů je mezi jednotlivými dávkami promývána a automat je vybaven UV zářičem, který vyzařuje jeho vnitřní prostor (31).



## 4.3 Polymerázová řetězová reakce

### 4.3.1 End-point PCR

Polymerázovou řetězovou reakci (PCR) objevil v roce 1983 Kary B. Mullis. Principem této metody je mnohonásobná amplifikace specifického úseku DNA, který je komplementární s hybridizační sondou, in vitro. Pokud je metodou PCR amplifikována nukleová kyselina infekčního agens, představuje hybridizační sonda druhově či rodově specifickou sekvenci nukleové kyseliny. V praxi rutinních testů je nezbytné, aby v těchto sekvencích nedocházelo k bodovým mutacím. Syntéza nových řetězců DNA probíhá v opakujících se cyklech. Prvním krokem PCR je tepelná denaturace DNA, uvolnění z infekčního agens. Ta probíhá při 90°C. Při takovéto teplotě dochází k rozvolnění vodíkových můstků, které spojují komplementární nukleotidy. Výsledkem denaturace je jednořetězcová DNA (ssDNA), která slouží jako templát, podle kterého je nasyntetizován komplementární řetězec. Templátem však může být i RNA. V tomto případě se však přepisuje do cDNA. Nezbytné pro zahájení polymerázové řetězové reakce jsou primery, což jsou chemicky nasyntetizované oligonukleotidy tvořené obvykle dvaceti až pětadvaceti nukleotidy. Nasednutím primeru na komplementární úsek templátového řetězce je PCR zahájena. Tento proces je označován jako annealing primerů a probíhá obvykle při 60°C. Syntéza komplementárního řetězce začíná od 3' konce a je uskutečňována pomocí DNA polymerasy přiřazováním nukleotidů podle komplementarity bazí. Tato fáze PCR je označována jako elongace. Ideální teplota pro elongaci je 72°C. Nejčastěji používanými DNA polymerázami jsou termostabilní DNA polymerázy, a to z toho důvodu, že jejich stabilita přetrvává i ve velmi vysokých teplotách (až 98°C) (30,32).

Výsledkem tohoto procesu je nově nasyntetizovaná dvouřetězcová DNA (dsDNA), označovaná jako amplikon. Protože během cyklu dochází k syntéze

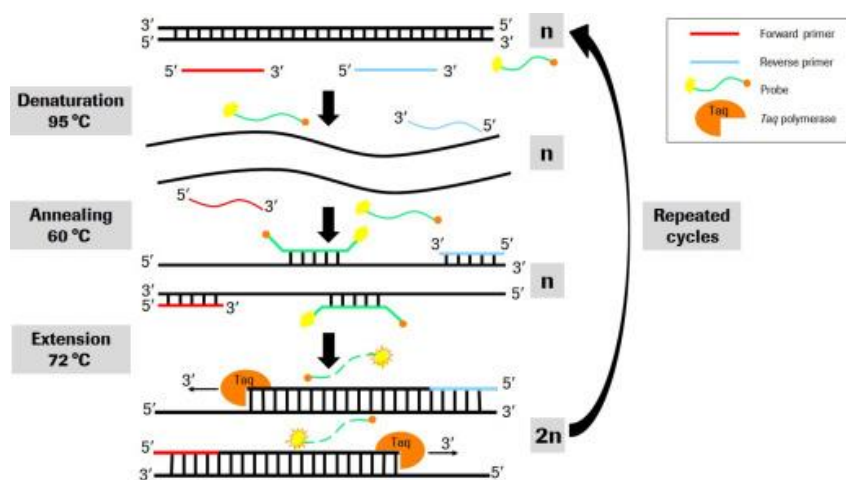
obou řetězců matricové DNA, vzniknou během tohoto cyklu dvě nově nasyntetizované dsDNA, tedy dva amplikony. Druhý cyklus probíhá stejně, jako první. Nevzniknou však dva amplikony, ale čtyři. S každým dalším cyklem je počet nově nasyntetizovaných dsDNA zdvojnásoben. Po získání dostatečného množství amplikonů je možné amplikony ponechat ve formě ds, jejichž vizualizace se provádí elektroforézou, nebo amplikony převést denaturací do ss formy a prokazovat značenými hybridizačními sondami (30,32).

Reakční směs pro PCR obsahuje nejen primery, ale i deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP), DNA polymerázu a pufr, ve kterém jsou obsaženy hořčičnaté ionty. Pokud jde o amplifikaci RNA, pak i ionty manganu (pro reverzní transkripci do cDNA). V amplifikační zkumavce je obvykle smíšeno 50 µl reakční směsi a 50 µl roztoku izolované nukleové kyseliny (30, 32).

#### 4.3.2 Real-time PCR

Real-time PCR neboli PCR v reálném čase se od klasické (end-point) PCR liší tím, že PCR produkt lze přímo kvantifikovat bezprostředně po jeho vzniku, proto je někdy real-time PCR označována jako kinetická. Kvantifikaci produktu v reálném čase umožňují fluorescenční sondy (obr. 5), což jsou oligonukleotidy, které jsou na 5'konci označené fluorescenčním barvivem. Na 3' konci mají pak tyto sondy tzv. quencher (neboli zhášec). Quencher se na sondě uplatňuje jako tlumič tzv. reporteru, který emituje záření. Proces, kterým quencher tlumí reporter je označován jako proces Foerstrova rezonančního přenosu energie (FRET). Význam těchto sond je v navázání na specifickou komplementární sekvenci ssDNA. Na ssDNA nasedne také na jiném místě primer, který zahájí elongaci řetězce. V momentě, kdy je v procesu elongace nalezena sonda, dojde k odštěpení reporteru z tlumivého quencheru, a dochází k emisi fluorescence. Během reakce je detekován a kvantifikován fluorescenční signál. Produkty PCR není tedy nutné detekovat elektroforézou, jak je tomu u klasické PCR (31).

Hybridizačních fluorescenčních sond je komerčně vyráběna celá řada. Nejčastěji používanou sondou je TaqMan® sonda. Sondy TaqMan® představují oligonukleotidy, které jsou značené fluorofory na obou koncích, kdy je na 5' konci navázaný fluorofor s krátkou vlnovou délkou, tzv. reporter, a na 3' konci quencher, tj. fluorofor s delší vlnovou délkou. Reporter, pak předává energii quencheru. Dojde k utlumení původního záření fluoroforu, které přetrvává i po nasednutí sondy. Ta nasedá s primery v jeden okamžik. Místem nasednutí sondy je komplementární úsek vzdálený od 3' konce primeru. Dochází k elongaci nově vytvořeného řetězce. Elongace pokračuje k místu navázané sondy, kde začíná proces replikace DNA, který je shodný s replikací DNA in vivo. Vodíkové můstky, které váží sondu k sekvenci, jsou uvolněny, a dojde k aktivaci exonukleázové podjednotky rekombinantní rTth (*Thermus thermophilus*) polymerázy. Vlivem rTth polymerázy dochází k rozpadu sondy. Z quencheru se uvolní fluorofor, který začne emitovat fluorescenční záření o krátké vlnové délce. Toto záření je detekováno jako fluorescenční signál. Záření quencheru ustává. Fluorescenční signál je detekován po každém nově nasynthetizovaném řetězci. Tím umožňuje kvantifikaci reakce a je tak často využíván pro real-time PCR. Dalšími používanými sondami jsou SimpleProbes, FRET-sondy (Fluorescence Resonance Energy Transfer), Molecular Beacons nebo sondy Scorpions. Sondy jsou vybírány na základě požadavků na finální výsledek PCR. Například hybridizační sondy Molecular Beacons jsou využívány v multiplexních testech pro diagnostiku infekcí. Důvod využití těchto sond v multiplexních testech je ten, že tyto sondy mohou být syntetizovány s fluorofory různých barev (33).



**Obrázek 5** Schéma jednoho cyklu real-time PCR (34)

V současné době je popsáno několik typů PCR reakcí, které se liší svým průběhem a vlastnostmi. Pro praktickou část této bakalářské práce jsou však významné jen dva typy PCR, a to real-time PCR a end-point PCR.

#### 4.3.3 Reverzní Dot-Blot

Reverzní Dot-Blot představuje hybridizační techniku, která využívá hybridizační sondy navázané na pevný nosič. Tyto sondy jsou součástí mnoha komerčních souprav a představují tzv. „záchytné sondy“ pro produkty PCR reakcí. Hybridizace na pevném nosiči je využívána zejména pro současné zjišťování několika parametrů infekčních agens, například pro určení jejich genotypů. Test probíhá pomocí nylonového proužku, na který je navázáno až dvacet různých hybridizačních sond. Nylonový proužek je ponořen do nádoby o objemu tři mililitry, ve které je hybridizační roztok a izolovaná nebo naamplifikovaná nukleová kyselina, značená biotinem. Biotin umožňuje vizualizaci hybridizační reakce. Nukleovou kyselinu, která nebyla sondou označena před hybridizací, lze označit po hybridizaci značenou sondou nebo značenou protilátkou, působící proti nukleové kyselině. Tato značená sonda

je komplementární s jiným úsekem nukleové kyseliny. Tímto typem hybridizace lze určit požadovanou sekvenci nukleové kyseliny, nikoli však velikost této sekvence (35).

## **4.4 Postup práce**

### **4.4.1 Izolace nukleových kyselin**

Přijaté vzorky byly nejprve řádně promíchány pomocí vortexové třepačky. Následně bylo do 2 ml zkumavek, označených čárovým kódem, přeneseno 400 µl vzorku. Čárové kódy 2 ml zkumavek byly naskenovány. Izolace nukleových kyselin byla prováděna pomocí analyzátoru MagNa Pure Compact™ firmy Roche, do kterého byly vloženy kazety s reagensii ze soupravy Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I. Tyto kazety jsou stejně jako 2 ml zkumavky označeny unikátními čárovými kódy, které byly naskenovány. Následovalo vložení kontejnerů se sterilními špičkami do prostoru pro ně určeného uvnitř analyzátoru. Po přenesení požadovaného objemu do 2 ml zkumavek byly tyto zkumavky přeneseny do stojánku, který je také součástí analyzátoru. Poté byl na displeji nastaven program, který určoval typ vzorku, vstupní (400 µl) a eluční (100 µl) objem, číslo vzorku atd. Použitý program byl Total\_NA\_Plazma\_100\_400\_V3\_2. Po vložení všech potřebných komponent a navolení programu, byla uzavřena dvířka pracovního prostoru a přístroj stisknutím startovacího tlačítka spuštěn. Po třiceti minutách byla izolace dokončena a výsledky vytištěny. Zkumavky s vyizolovanou nukleovou kyselinou byly vyňaty, zašroubovány a uloženy do stojánku. V této fázi byly, zlyzované a 4x zakoncentrované vzorky nukleových kyselin připraveny k dalšímu použití.



*Obrázek 6 Analyzátor MagNA Pure Compact™ pro izolaci nukleových kyselin (vlastní zdroj)*



*Obrázek 7 Kazeta s reagensy pro izolaci nukleové kyseliny (vlastní zdroj)*



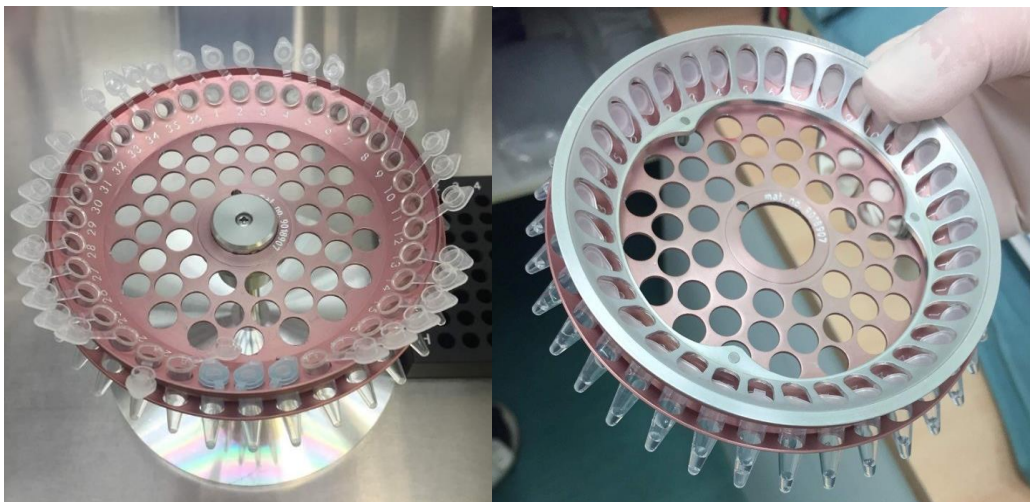
*Obrázek 8 Pracovní prostor izolátoru připravený před zahájením izolace (vlastní zdroj)*



*Obrázek 9 Hotové vzorky připravené k další analýze (vlastní zdroj)*

#### 4.4.2 Real-time PCR test pro *Helicobacter pylori*

Test na přítomnost *Helicobacter pylori* byl proveden pomocí analyzátoru Qiagen Rotorgene od firmy Corbett Qiagen. K testování byl použit komerční Real-Time Test na *Helicobacter pylori* od firmy Sacace Biotechnologies. Do Eppendorfových mikrozkušavek bylo odpipetováno 10 µl vzorků nukleových kyselin a 25 µl reakční směsi, která byla připravena dle návodu výrobce. Následně byly mikrozkušavky uzavřeny víčkem a vloženy do rotoru, který obsahoval 36 pozic. Do první pozice rotoru byla umístěna negativní kontrola, do druhé pozice pozitivní. Reakční mikrozkušavky se vzorky byly zajištěny víčkem rotoru. Následně byl rotor vložen do analyzátoru. Ten byl nastaven na program uvedený v návodu výrobce. Detekce probíhala ve dvou kanálech „green“ a „yellow“. Kanál „green“ značil interní kontrolu a kanál „yellow“ nukleovou kyselinu *Helicobacter pylori*.



**Obrázek 10** Rotor s napipetovanými vzorky nukleových kyselin před zajištěním a po zajištění (vlastní zdroj)





*Obrázek 11 Rotor umístěný v analyzátoru před spuštěním vlastní analýzy (vlastní zdroj)*

#### **4.4.3 Genotypizace *Helicobacter pylori***

Genotypizace pozitivních vzorků *Helicobacter pylori* byla provedena pomocí Real-time PCR analyzátoru LightCycler® v. 2.0 firmy Roche. Pomocí multiplexních real-time PCR se sondami TagMan™, připravenými podle vanDoorna et al. (36,37) ve spolupráci se společností TIB-MolBiol Berlin, SRN s využitím souprav LightCycler® Real-time TaqMan™ PCR KIT Roche. Pomocí těchto sond lze, díky přítomnosti fluoroforů, emitujících záření o různých vlnových délkách odečítat fluorescenční signály v 6 kanálech, a tím rozlišit jednotlivé genotypy *Helicobacter pylori*. Pomocí použitých TaqMan™ sond bylo možné detekovat vzorky, které obsahovaly genotypy *Helicobacter pylori* pozitivní na CagA a VacA proteiny. Dále byly pomocí specifických sond detekovány specifické úseky DNA *Helicobacter pylori*, konkrétně tedy alely s1/s2 a alely m1/m2.

#### 4.4.4 Real-time PCR test pro HPV

Test HPV byl stejně jako test *Helicobacter pylori* proveden pomocí analyzátoru Qiagen Rotorgene od firmy Corbett Qiagen. Tentokrát byla však použita komerční souprava pro kvantitativní detekci vysoce rizikových humánních papillomavirů HPV Risk Screen Real-TM Quant. Příprava vzorků pro real-time PCR byla obdobná jako pro *Helicobacter pylori*. Při přípravě reagensů bylo postupováno podle návodu výrobce. Po vložení rotoru do analyzátoru byl navolen program určený výrobcem komerční soupravy. Detekce opět probíhala v několika kanálech, kdy kanál „green“ značil interní kontrolu, zatímco kanály „yellow“, „orange“, a „red“ značily jednotlivé skupiny HPV, a to A5/A6, A7 a A9. Skupiny byly rozlišeny pomocí primerů obsažených v PCR mixu, který byl součástí komerční soupravy. Pomocí kombinace detekčních sond pro jednotlivé skupiny HPV umožňuje tento test určovat nejfrekventovanější „high risk“ typy 16, 18, 31, 33, 45. Celkem lze soupravou prokázat až třináct typů HPV.

## 5 VÝSLEDKY

Tabulka 1 Výsledky vzorků kontrolní skupiny pacientů

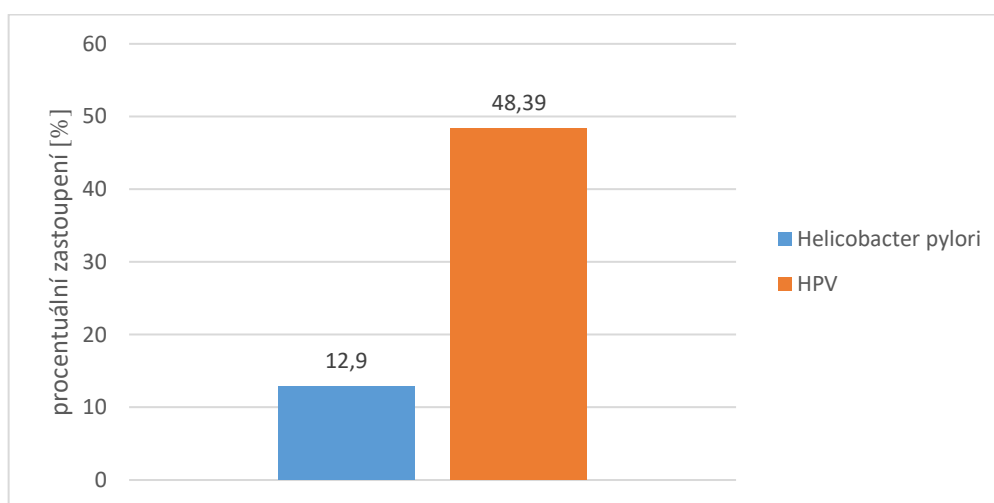
Vzorek	Materiál	<i>Helicobacter pylori</i>					HPV			
		Cag A	vacA s1a s1b		s2	m1	m2	A5+6	A7	A9
1.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
2.	Sliny+výtěr	+			+	+			+	
3.	Sliny+výtěr	negativní					+			
4.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
5.	Sliny+výtěr	negativní						+		
6.	Sliny+výtěr	negativní					+			
7.	Sliny+výtěr	-	+				+		+	
8.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
9.	Sliny+výtěr	negativní					+			
10.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
11.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
12.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
13.	Sliny+výtěr	negativní					+			
14.	Sliny+výtěr	-		+			+			
15.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
16.	Sliny+výtěr	negativní						+		
17.	Sliny+výtěr	negativní					+			
18.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
19.	Sliny+výtěr	negativní					+			
20.	Sliny+výtěr	+	+			+			negativní	
21.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
22.	Papilom+výtěr	negativní								+
23.	Sliny+výtěr	negativní						+		
24.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
25.	Sliny+výtěr	negativní					+	+		
26.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
27.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
28.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
29.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
30.	Sliny+výtěr	negativní					negativní			
31.	Sliny+výtěr	negativní					+			

*Tabulka 2 Záchyt Helicobacter pylori a humánních HPV ve vzorcích kontrolní skupiny*

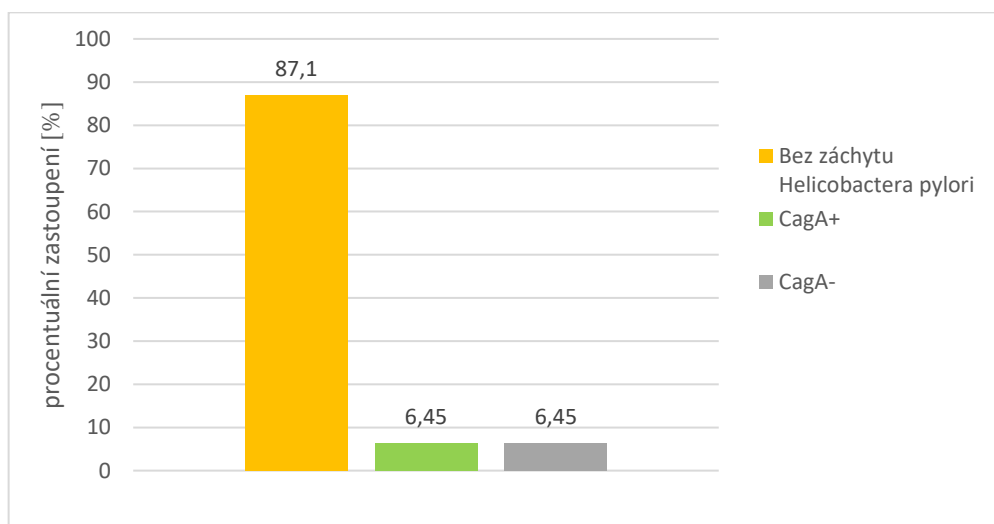
<b>Vzorek</b>	<b>Materiál</b>	<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	<b>HPV</b>
1.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
2.	Sliny+výtěr	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
3.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
4.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
5.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
6.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
7.	Sliny+výtěr	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
8.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
9.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
10.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
11.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
12.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
13.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
14.	Sliny+výtěr	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
15.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
16.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
17.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
18.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
19.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
20.	Sliny+výtěr	<b>Ano</b>	Ne
21.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
22.	Papilom+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
23.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
24.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
25.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>
26.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
27.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
28.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
29.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
30.	Sliny+výtěr	Ne	Ne
31.	Sliny+výtěr	Ne	<b>Ano</b>

**Tabulka 3** Výskyt CagA v *Helicobacter pylori* pozitivních vzorcích kontrolní skupiny

Vzorek	Materiál	CagA
2.	Sliny+výtěry	<b>Pozitivní</b>
7.	Sliny+výtěry	Negativní
14.	Sliny+výtěry	Negativní
20.	Sliny+výtěry	<b>Pozitivní</b>



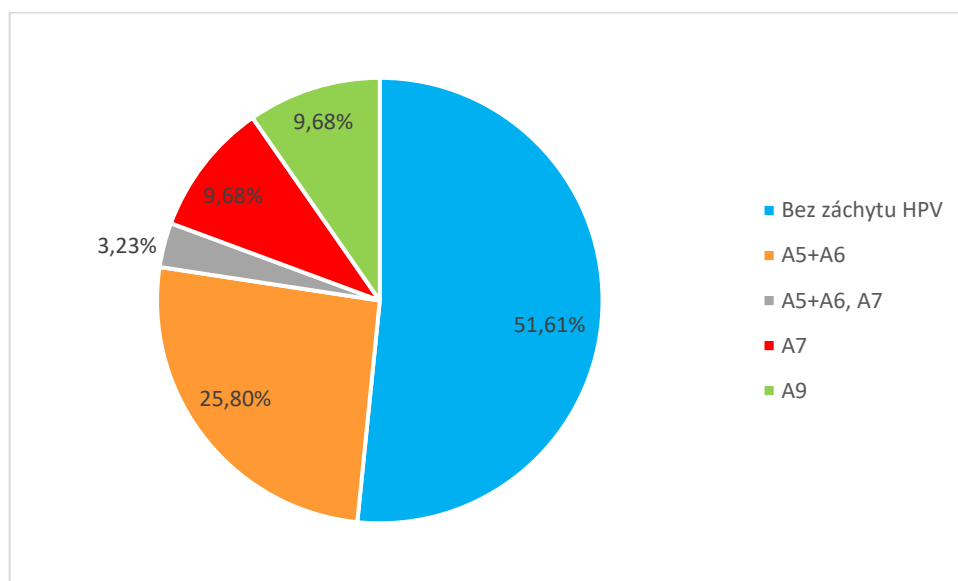
**Obrázek 12** Procentuální vyjádření výskytu *Helicobacter pylori* a HPV ve všech vzorcích kontrolní skupiny



**Obrázek 13** Procentuální zastoupení vzorků bez záchytu *Helicobacter pylori* a prokázanými CagA+ a CagA- *Helicobacter pylori* ve vzorcích kontrolní skupiny

**Tabulka 4** Genotypizace HPV ze vzorků pacientů kontrolní skupiny

Vzorek	Materiál	Skupina HPV	HPV (možné genotypy)
2.	Sliny+výtěr	A9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
3.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
5.	Sliny+výtěr	A7	18, 45, 59, 68
6.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
7.	Sliny+výtěr	A9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
9.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
13.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
14.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
16.	Sliny+výtěr	A7	18, 45, 59, 68
17.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
19.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
22.	Papilom+výtěr	A9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
23.	Sliny+výtěr	A7	18, 45, 59, 68
25.	Sliny+výtěr	A5+A6, A7	18 nebo 45
31.	Sliny+výtěr	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82



**Obrázek 14** Procentuální zastoupení skupin HPV ve vzorcích kontrolní skupiny

Tabulka 5 Výsledky vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami

Vzorek	Materiál	<i>Helicobacter pylori</i>						HPV		
		cagA	vacA					A5+6	A7	A9
			s1a	s1b	s2	m1	m2			
1.	Chr.tons.	-		+			+	negativní		
2.	Chr.tons.	-	+				+	+	+	
3.	Chr.tons.	negativní						negativní		
4.	Chr.tons.	-		+		+		+		
5.	Chr.tons.	-		+			+	+		
6.	Chr.tons.	-		+		+		+		+
7.	Chr.tons.	negativní						negativní		
8.	Chr.tons.	+		+		+		+		
9.	Chr.tons.	negativní							+	
10.	Chr.tons.	negativní						negativní		
11.	Chr.tons.	-		+		+		negativní		
12.	Chr.tons.	negativní						negativní		
13.	Chr.tons.	-	+			+		negativní		
14.	Chr.tons.	-		+			+	+	+	
15.	Chr.tons.	-	+				+	negativní		
16.	Chr.tons.	negativní						negativní		
17.	Chr.tons.	-		+			+	negativní		
18.	Chr.tons.	-	+				+	+		
19.	Chr.tons.	-	+			+		negativní		
20.	Chr.tons.	+		+		+				+
21.	Chr.tons.	+		+			+	negativní		
22.	Chr.tons.	-	+				+		+	
23.	Chr.tons.	-			+		+	negativní		
24.	Chr.tons.	negativní						negativní		
25.	Chr.tons.	negativní						negativní		
26.	Chr.tons.	-	+			+		+	+	
27.	Chr.tons.	-			+	+		negativní		
28.	Chr.tons.	-	+				+	+		
29.	Chr.tons.	-		+			+	negativní		
30.	Chr.tons.	+	+				+	+		+
31.	Chr.tons.	-			+	+		+	+	
32.	Chr.tons.	negativní						negativní		
33.	Chr.tons.	-			+		+	negativní		
34.	Chr.tons.	-	+			+		+	+	
35.	Chr.tons.	negativní						+		
36.	Chr.tons.	negativní						negativní		
37.	Chr.tons.	-	+				+	+		
38.	Chr.tons.	+		+		+		negativní		

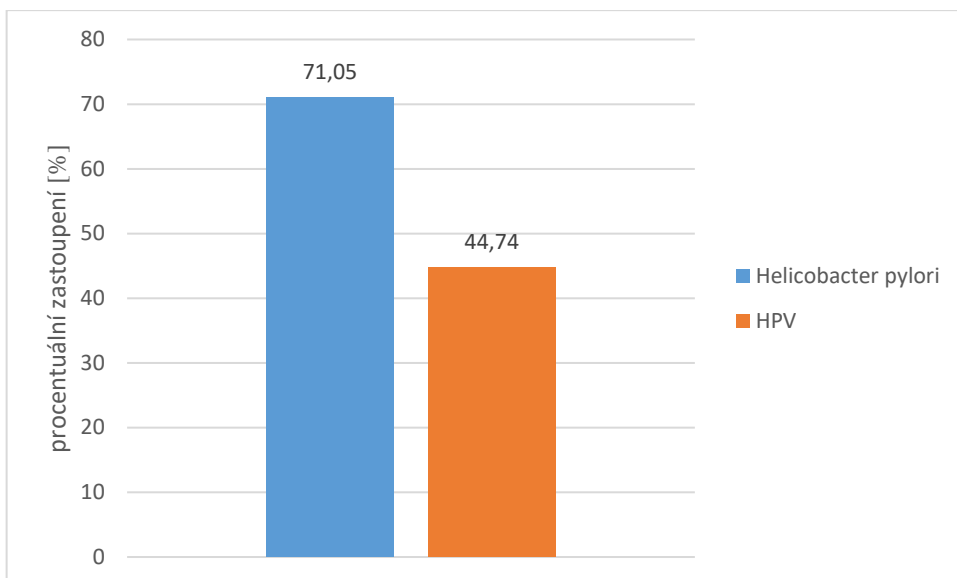
*Tabulka 6 Záchyt Helicobacter pylori a humánních HPV ve vzorcích pacientů s chronickými tonsilitidami*

<b>Vzorek</b>	<b>Materiál</b>	<b>Helicobacter pylori</b>	<b>HPV</b>
1.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
2.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
3.	Chr.tons.	Ne	Ne
4.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
5.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
6.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
7.	Chr.tons.	Ne	Ne
8.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
9.	Chr.tons.	Ne	<b>Ano</b>
10.	Chr.tons.	Ne	Ne
11.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
12.	Chr.tons.	Ne	Ne
13.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
14.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
15.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
16.	Chr.tons.	Ne	Ne
17.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
18.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
19.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
20.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
21.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
22.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
23.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
24.	Chr.tons.	Ne	Ne
25.	Chr.tons.	Ne	Ne
26.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
27.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
28.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
29.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
30.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
31.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
32.	Chr.tons.	Ne	Ne
33.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne
34.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
35.	Chr.tons.	Ne	<b>Ano</b>
36.	Chr.tons.	Ne	Ne
37.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
38.	Chr.tons.	<b>Ano</b>	Ne

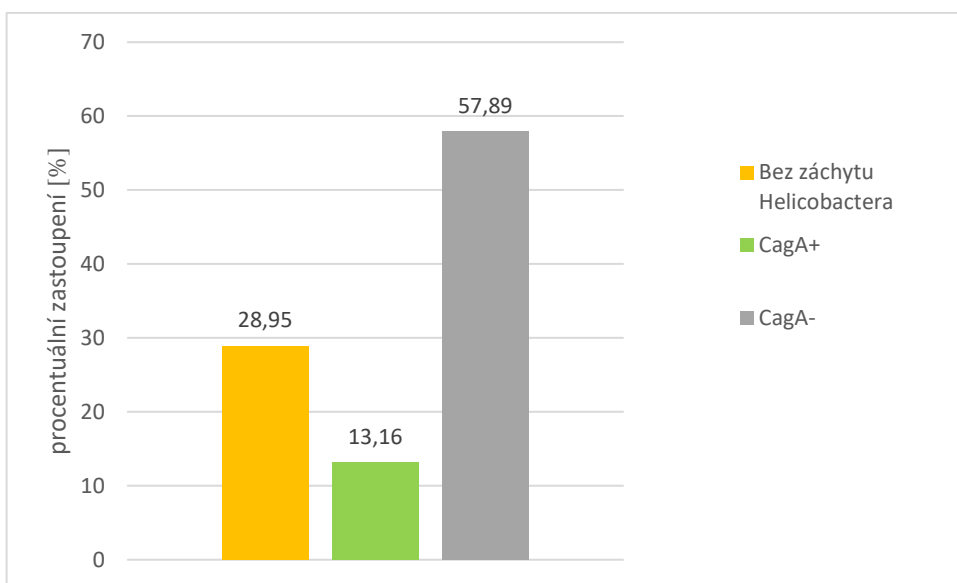


*Tabulka 7 Výskyt Cag A v Helicobacter pylori pozitívnych vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami*

<b>Vzorek</b>	<b>Materiál</b>	<b>Cag A</b>
1.	Chr.tons.	Negativní
2.	Chr.tons.	Negativní
4.	Chr.tons.	Negativní
5.	Chr.tons.	Negativní
6.	Chr.tons.	Negativní
8.	Chr.tons.	<b>Pozitivní</b>
11.	Chr.tons.	Negativní
13.	Chr.tons.	Negativní
14.	Chr.tons.	Negativní
15.	Chr.tons.	Negativní
17.	Chr.tons.	Negativní
18.	Chr.tons.	Negativní
19.	Chr.tons.	Negativní
20.	Chr.tons.	<b>Pozitivní</b>
21.	Chr.tons.	<b>Pozitivní</b>
22.	Chr.tons.	Negativní
23.	Chr.tons.	Negativní
26.	Chr.tons.	Negativní
27.	Chr.tons.	Negativní
28.	Chr.tons.	Negativní
29.	Chr.tons.	Negativní
30.	Chr.tons.	<b>Pozitivní</b>
31.	Chr.tons.	Negativní
33.	Chr.tons.	Negativní
34.	Chr.tons.	Negativní
37.	Chr.tons.	Negativní
38.	Chr.tons.	<b>Pozitivní</b>



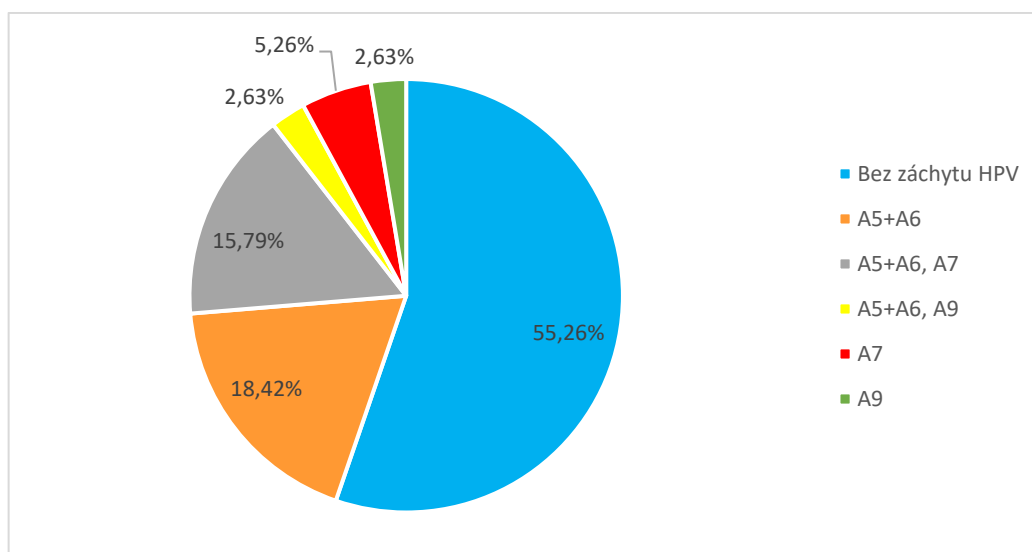
**Obrázek 15** Procentuální vyjádření výskytu *Helicobacter pylori* a HPV ve všech vzorcích pacientů testovaných na chronické tonsilitidy



**Obrázek 16** Procentuální zastoupení vzorků bez záchytu *Helicobacter pylori* a prokázanými CagA+ a CagA- *Helicobacter pylori* ve vzorcích pacientů testovaných na chronické tonsilitidy

**Tabulka 8** Genotypizace HPV ze vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami

Vzorek	Materiál	Skupina HPV	HPV (možné genotypy)
2.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45
4.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
5.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
6.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
8.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
9.	Chr. tons.	A7	18, 45, 59, 68
14.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45
18.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
20.	Chr. tons.	A9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
22.	Chr. tons.	A7	18, 45, 59, 68
26.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45
28.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
30.	Chr. tons.	A5+A6, A9	16 nebo 31 nebo 33
31.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45
34.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45
35.	Chr. tons.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
37.	Chr. tons.	A5+A6, A7	18 nebo 45



**Obrázek 17** Procentuální zastoupení skupin HPV ze vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami

**Tabulka 9** Výsledky vzorků pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz

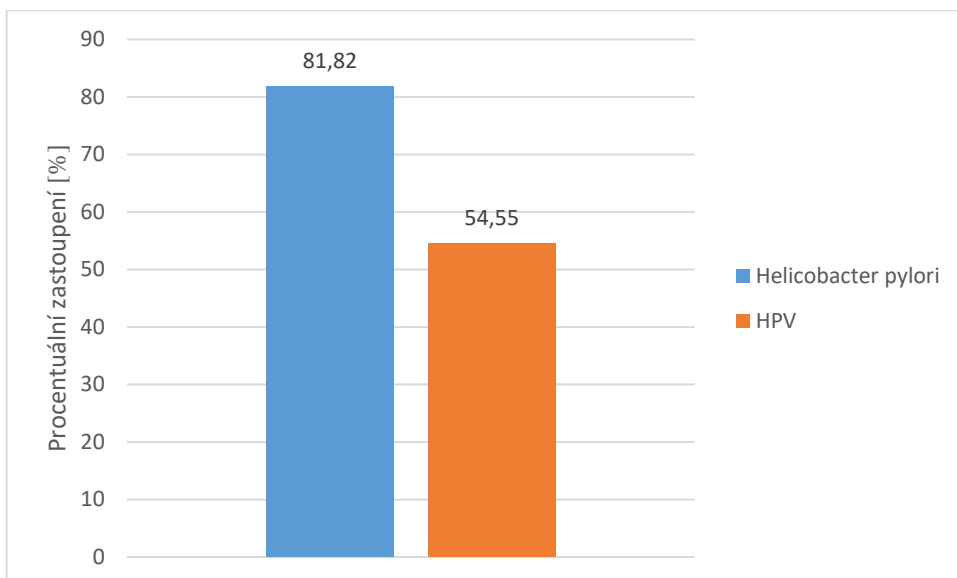
Vzorek	Materiál	<i>Helicobacter pylori</i>						HPV			
		cagA	vacA					A5+6	A7	A9	
			s1a	s1b	s2	m1	m2				
1.	Ca tonsil	-		+			+	+			
2.	Ca tonsil	-		+			+	negativní			
3.	Ca tonsil	-	+				+				
4.	Ca tonsil	negativní						negativní			
5.	Ca orof.	-		+			+				
6.	Ca orof.	-	+				+		+		
7.	Ca tonsil	-		+			+	negativní			
8.	Ca orof.	+	+				+	negativní			
9.	Ca tonsil	+		+			+	negativní			
10.	Ca orof.	-		+			+		+		
11.	Ca tonsil	+	+				+	negativní			
12.	Ca tonsil	-			+		+				
13.	Ca tonsil	-		+			+				
14.	Ca orof.	-	+				+			+	
15.	Ca orof.	negativní						negativní			
16.	Ca orof.	+	+				+	negativní			
17.	Ca tonsil	-		+			-	negativní			
18.	Ca orof.	-		+			+		+		
19.	Ca tonsil	+	+				+				
20.	Ca tonsil	-		+			+				
21.	Ca sl.žláz	negativní						negativní			
22.	Ca orof.	-		+			+			+	
23.	Ca tonsil	-	+				+		+		
24.	Ca sl.žláz	+			+		+	negativní			
25.	Ca tonsil	+	+				+	negativní			
26.	Ca orof.	+		+			+				
27.	Ca orof.	negativní						+	+		
28.	Ca tonsil	+	+				+	negativní			
29.	Ca tonsil	-		+			+				
30.	Ca tonsil	-	+				+	negativní			
31.	Ca orof.	+	+	+			+				
32.	Ca tonsil	negativní									+
33.	Ca orof.	negativní						negativní			

**Tabulka 10** Záchyt *Helicobacter pylori* a humánních HPV ve vzorcích pacientů s karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz

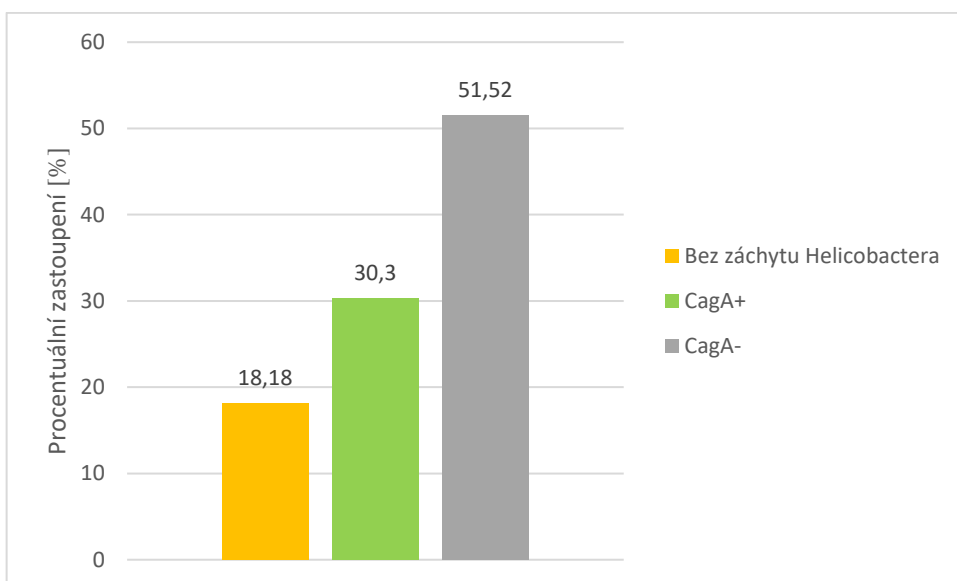
<b>Vzorek</b>	<b>Materiál</b>	<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	<b>HPV</b>
1.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
2.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
3.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
4.	Ca tonsil	Ne	Ne
5.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
6.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
7.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
8.	Ca orof.	<b>Ano</b>	Ne
9.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
10.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
11.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
12.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
13.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
14.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
15.	Ca orof.	Ne	Ne
16.	Ca orof.	<b>Ano</b>	Ne
17.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
18.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
19.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
20.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
21.	Ca sl.žláz	Ne	Ne
22.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
23.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
24.	Ca sl.žláz	<b>Ano</b>	Ne
25.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
26.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
27.	Ca orof.	Ne	<b>Ano</b>
28.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
29.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
30.	Ca tonsil	<b>Ano</b>	Ne
31.	Ca orof.	<b>Ano</b>	<b>Ano</b>
32.	Ca tonsil	Ne	<b>Ano</b>
33.	Ca orof.	Ne	Ne

*Tabulka 11 Výskyt CagA v Helicobacter pylori pozitivních vzorcích pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz*

<b>Vzorek</b>	<b>Materiál</b>	<b>CagA</b>
1.	Ca tonsil	Negativní
2.	Ca tonsil	Negativní
3.	Ca tonsil	Negativní
5.	Ca orofaryngu	Negativní
6.	Ca orofaryngu	Negativní
7.	Ca tonsil	Negativní
8.	Ca orofaryngu	<b>Pozitivní</b>
9.	Ca tonsil	<b>Pozitivní</b>
10.	Ca orofaryngu	Negativní
11.	Ca tonsil	<b>Pozitivní</b>
12.	Ca tonsil	Negativní
13.	Ca tonsil	Negativní
14.	Ca orofaryngu	Negativní
16.	Ca orofaryngu	<b>Pozitivní</b>
17.	Ca tonsil	Negativní
18.	Ca orofaryngu	Negativní
19.	Ca tonsil	<b>Pozitivní</b>
20.	Ca tonsil	Negativní
22.	Ca orofaryngu	Negativní
23.	Ca tonsil	Negativní
24.	Ca slinných žláz	<b>Pozitivní</b>
25.	Ca tonsil	<b>Pozitivní</b>
26.	Ca orofaryngu	<b>Pozitivní</b>
28.	Ca tonsil	<b>Pozitivní</b>
29.	Ca tonsil	Negativní
30.	Ca tonsil	Negativní
31.	Ca orofaryngu	<b>Pozitivní</b>



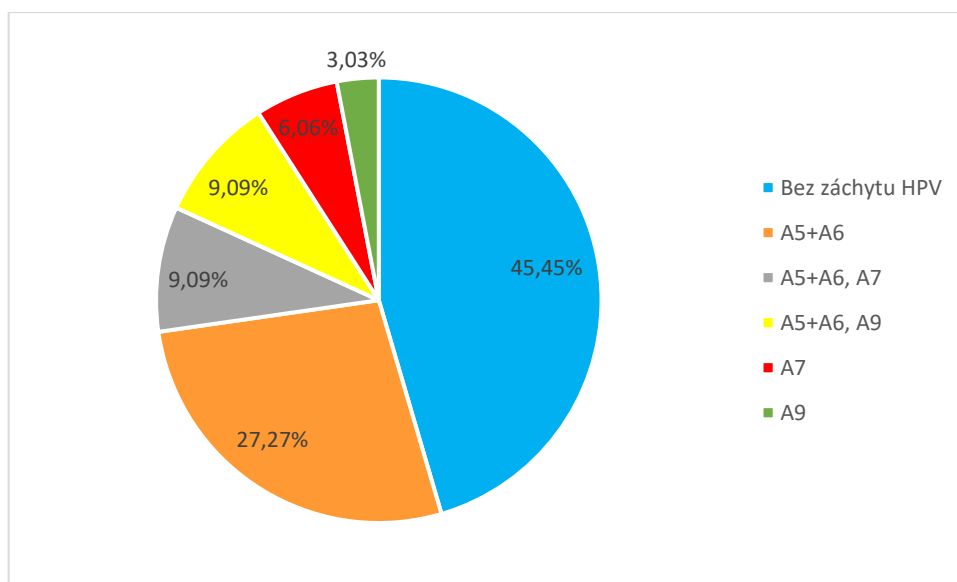
**Obrázek 18** Procentuální vyjádření výskytu *Helicobacter pylori* a HPV ve všech vzorcích pacientů testovaných na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz



**Obrázek 19** Procentuální zastoupení vzorků bez záchytu *Helicobacter pylori* a CagA+ a CagA- ve vzorcích pacientů testovaných na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz

**Tabulka 12** Genotypizace HPV ze vzorků pacientů trpících na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz

Vzorek	Materiál	Skupina HPV	HPV (možné genotypy)
1.	Ca tonsil	A5+A6, A7	18 nebo 45
3.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
5.	Ca orofar.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
6.	Ca orofar.	A5+A6, A9	16 nebo 31 nebo 33
10.	Ca orofar.	A7	18, 45, 59, 68
12.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
13.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
14.	Ca orofar.	A5+A6, A9	16 nebo 31 nebo 33
18.	Ca orofar.	A5+A6, A7	18 nebo 45
19.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
20.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
22.	Ca orofar.	A5+A6, A9	16 nebo 31 nebo 33
23.	Ca tonsil	A7	18, 45, 59, 68
26.	Ca orofar.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
27.	Ca orofar.	A5+A6, A7	18 nebo 45
29.	Ca tonsil	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
31.	Ca orofar.	A5+A6	16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, 82
32.	Ca tonsil	A9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67

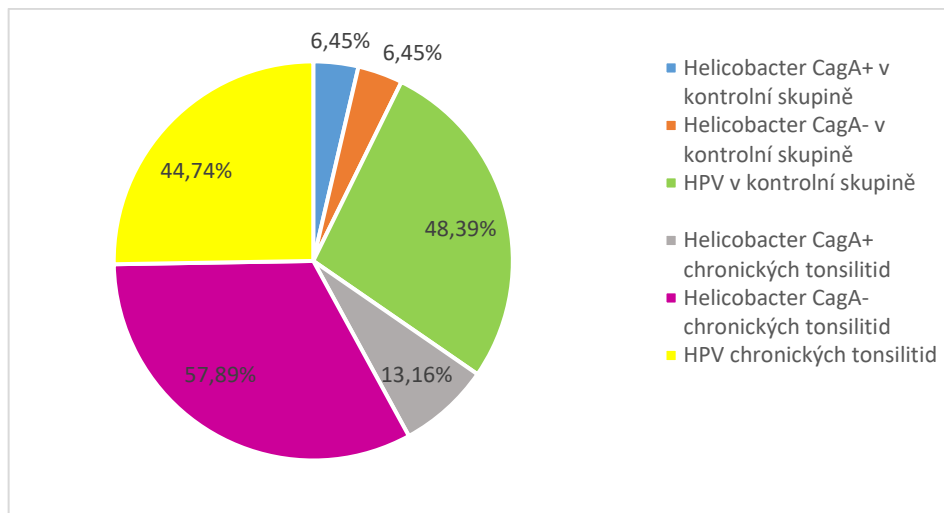


**Obrázek 20** Procentuální zastoupení skupin HPV ze vzorků pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz

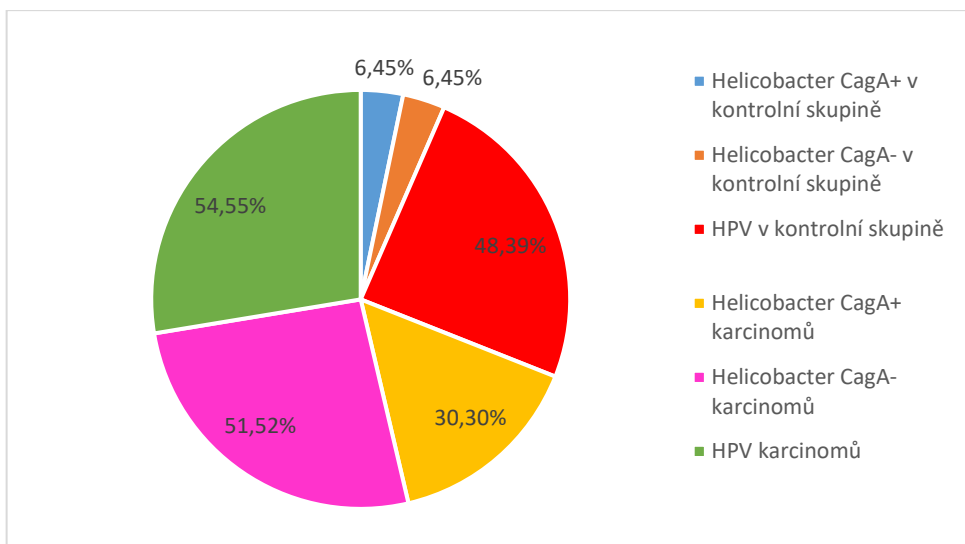


**Tabulka 13** Přehled procentuálního zastoupení *Helicobacter pylori* CagA+ a Cag A- a HPV v jednotlivých testovaných skupinách

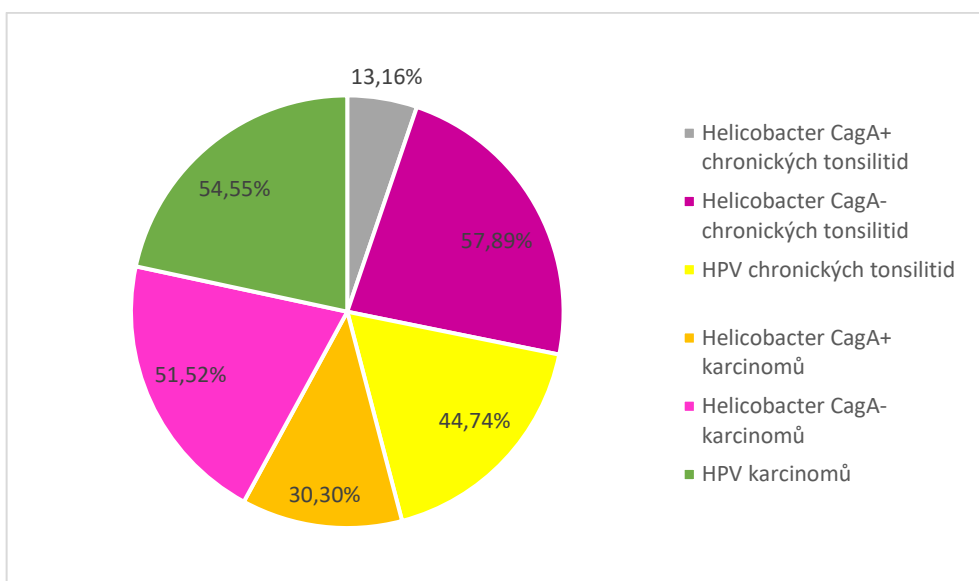
	Kontrolní skupina	Chronické tonsilitidy	Karcinomy
<b>Helicobacter Pylori</b>	<b>12,9 %</b>	<b>71,05 %</b>	<b>81,82 %</b>
CagA+	6,45 %	13,6 %	30,3 %
CagA-	6,45 %	57,89 %	51,52 %
<b>HPV</b>	<b>48,39 %</b>	<b>44,74 %</b>	<b>54,55 %</b>



**Obrázek 21** Procentuální zastoupení *Helicobacter pylori* a HPV ve vzorcích kontrolní skupiny a ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami



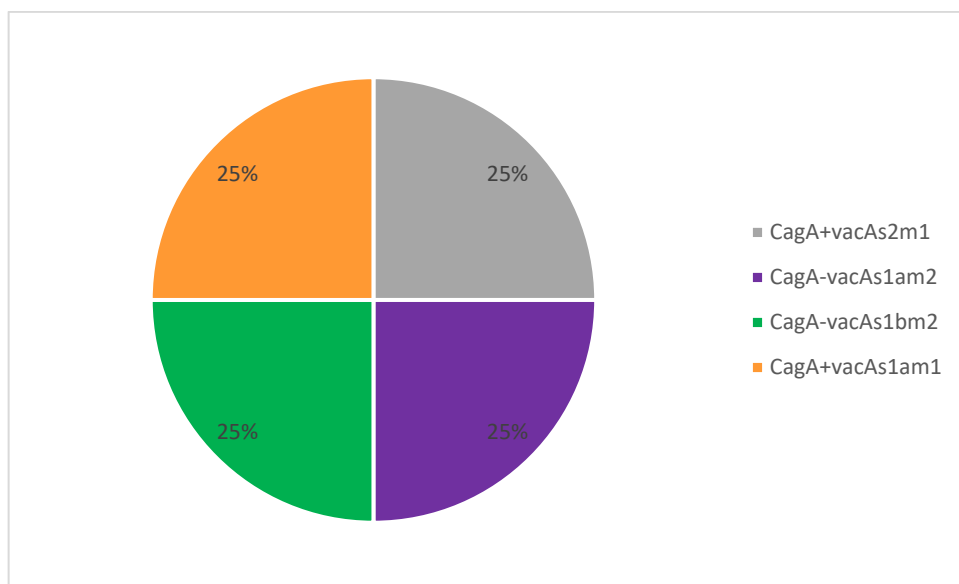
**Obrázek 22** Procentuální zastoupení *Helicobacter pylori* a HPV ve vzorcích kontrolní skupiny a ve vzorcích pacientů trpících karcinomy



**Obrázek 23** Procentuální zastoupení *Helicobacter pylori* a HPV ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami a ve vzorcích pacientů trpících karcinomy

**Tabulka 14** Genotypizace *Helicobacter pylori* a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích kontrolní skupiny

Vzorek	Materiál	Genotyp <i>Helicobacter</i>	Záchyt HPV
2.	Sliny+výtěry	CagA+vacAs2m1	Ano
7.	Sliny+výtěry	CagA-vacAs1am2	Ano
14.	Sliny+výtěry	CagA-vacAs1bm2	Ano
20.	Sliny+výtěry	CagA+ vacAs1am1	Ne



**Obrázek 24** Procentuální zastoupení genotypů *Helicobacter pylori* ve vzorcích kontrolní skupiny

**Tabulka 15** Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních ve vzorcích kontrolní skupiny se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-

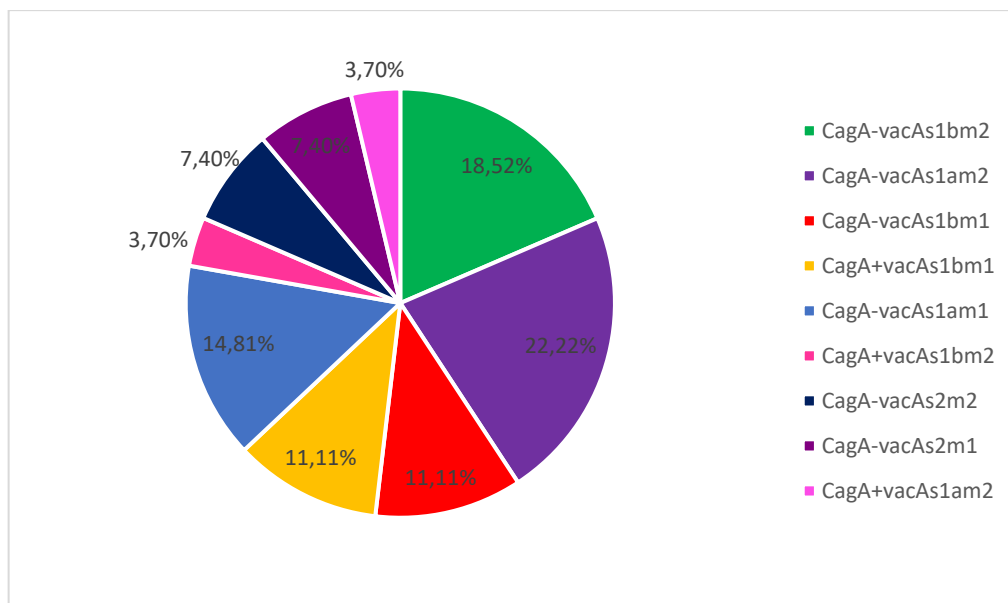
Cag A-	HPV pozitivní	HPV negativní
2	2 (100 %)	0 (0 %)

*Tabulka 16 Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních ve vzorcích kontrolní skupiny se záchytem Helicobacter pylori CagA+*

Cag A+	HPV pozitivní	HPV negativní
2	1 (50 %)	1 (50 %)

*Tabulka 17 Genotypizace Helicobacter pylori a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami*

Vzorek	Materiál	Genotyp Helicobacter	Záchyt HPV
1.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm2	Ne
2.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ano
4.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm1	Ano
5.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm2	Ano
6.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm1	Ano
8.	Chr.tons.	CagA+vacAs1bm1	Ano
11.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm1	Ne
13.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am1	Ne
14.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm2	Ano
15.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ne
17.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm2	Ne
18.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ano
19.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am1	Ne
20.	Chr.tons.	CagA+vacAs1bm1	Ano
21.	Chr.tons.	CagA+vacAs1bm2	Ne
22.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ano
23.	Chr.tons.	CagA-vacAs2m2	Ne
26.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am1	Ano
27.	Chr.tons.	CagA-vacAs2m1	Ne
28.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ano
29.	Chr.tons.	CagA-vacAs1bm2	Ne
30.	Chr.tons.	CagA+vacAs1am2	Ano
31.	Chr.tons.	CagA-vacAs2m1	Ano
33.	Chr.tons.	CagA-vacAs2m2	Ne
34.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am1	Ano
37.	Chr.tons.	CagA-vacAs1am2	Ano
38.	Chr.tons.	CagA+vacAs1bm1	Ne



**Obrázek 25** Procentuální zastoupení genotypů *Helicobacter pylori* ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami

**Tabulka 18** Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-

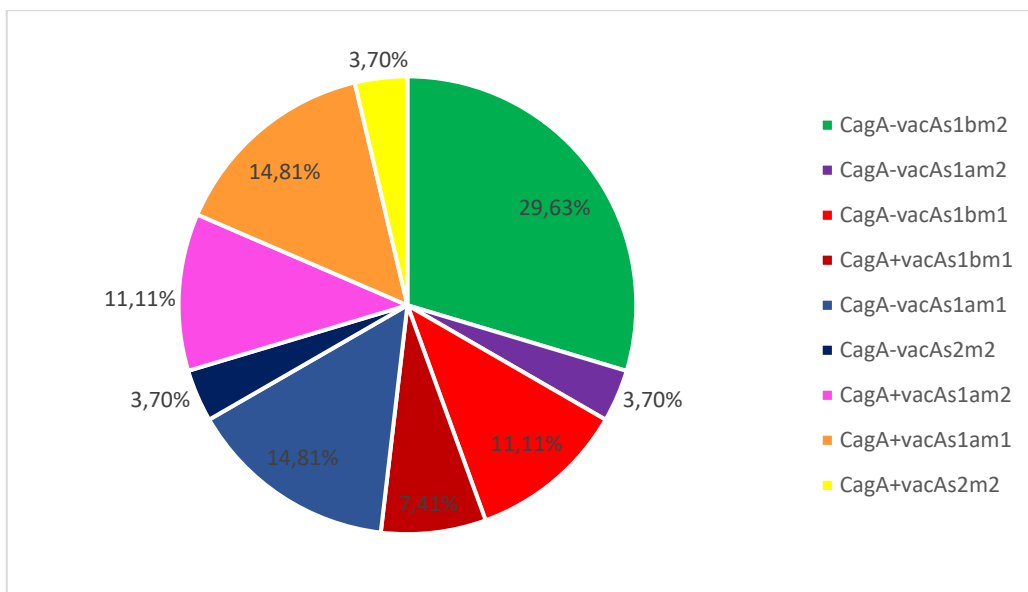
Cag A-	HPV pozitivní	HPV negativní
22	12 (54,55 %)	10 (45,45 %)

**Tabulka 19** Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami se záchytem *Helicobacter pylori* CagA+

Cag A+	HPV pozitivní	HPV negativní
5	3 (60 %)	2 (40 %)

**Tabulka 20** Genotypizace *Helicobacter pylori* a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích pacientů trpících karcinomy

Vzorek	Materiál	Genotyp <i>Helicobacter</i>	Záchyt HPV
1.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm2	Ano
2.	Ca tonsil	CagA-vacA s1bm2	Ne
3.	Ca tonsil	CagA-vacAs1am1	Ano
5.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1bm2	Ano
6.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1am1	Ano
7.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm2	Ne
8.	Ca orofaryngu	CagA+ vacAs1am1	Ne
9.	Ca tonsil	CagA+ vacAs1bm1	Ne
10.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1bm2	Ano
11.	Ca tonsil	CagA+ vacAs1am1	Ne
12.	Ca tonsil	CagA-vacAs2m2	Ano
13.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm2	Ano
14.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1am1	Ano
16.	Ca orofaryngu	CagA+ vacAs1am1	Ne
17.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm1	Ne
18.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1bm1	Ano
19.	Ca tonsil	CagA+ vacAs1am2	Ano
20.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm1	Ano
22.	Ca orofaryngu	CagA-vacAs1bm2	Ano
23.	Ca tonsil	CagA-vacAs1am1	Ano
24.	Ca slinných žláz	CagA+ vacAs2m2	Ne
25.	Ca tonsil	CagA+ vacAs1am2	Ne
26.	Ca orofaryngu	CagA+ vacAs1bm1	Ano
28.	Ca tonsil	CagA+ vacAs1am2	Ne
29.	Ca tonsil	CagA-vacAs1bm2	Ano
30.	Ca tonsil	CagA-vacAs1am2	Ne
31.	Ca orofaryngu.	CagA+ vacAs1am1	Ano



**Obrázek 26** Procentuální zastoupení genotypů *Helicobacter pylori* ve vzorcích pacientů trpících karcinomy

**Tabulka 21** Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících karcinomy se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-

Cag A-	HPV pozitivní	HPV negativní
17	13 (76,47 %)	4 (23,53 %)

**Tabulka 22** Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících karcinomy se záchytem *Helicobacter pylori* CagA+

Cag A+	HPV pozitivní	HPV negativní
10	3 (30 %)	7 (70 %)

## 6 DISKUZE

*Helicobacter pylori* je prokázaným patogenem způsobujícím chronické gastritidy, které mohou přecházet do stádia gastrických karcinomů. HPV prokazatelně způsobují maligní onemocnění cervixu uteri. Řada studií však naznačovala přítomnost těchto agens v oblasti orofaryngu. Některé studie hovořily o tom, že patogenem způsobujícím chronické tonsilitidy a následně karcinomy lymfatické tkáně a slinných žláz v oblasti orofaryngu je *Helicobacter pylori*. Jiné studie označují za hlavní faktor vzniku karcinomů v této oblasti HPV. Tato zjištění nás vedla k následujícím hypotézám. *Helicobacter pylori* je přítomen ve Waldeyerově lymfatickém okruhu, jehož součástí jsou tonsily, a působí tak vznik chronických tonsilitid a karcinomů. HPV jsou přítomny u pacientů trpících chronickými tonsilitidami a mohou být patogenním faktorem nebo mohou působit jako kofaktor *Helicobacter pylori* při vzniku těchto onemocnění.

V publikaci N. Cary Engleberga a spol. (37) se uvádí, že sérotypy CagA+ *Helicobacter pylori* představují větší riziko pro vznik zánětu a poškození gastrické mukózy než sérotypy CagA-negativní. Výsledky naší studie ukazují opak. U pacientů trpících chronickými tonsilitidami byla pomocí PCR prokázána přítomnost *Helicobacter pylori* cagA genu kódujícího CagA protein (CagA pozitivní) u 13,16 % vzorků, zatímco přítomnost *Helicobacter pylori* CagA-negativní byla prokázána u 57,89 % vzorků. U pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz byla zjištěna přítomnost *Helicobacter pylori* CagA pozitivní u 30,3 % vzorků a přítomnost *Helicobacter pylori* CagA-negativní u 51,52 %.

Publikace E. Pavlíka a spol. z roku 2007 (38) vyvrací výsledky studie Ciraka a spol. (2003), která se zabývala genotypizací kmenů *Helicobacter pylori* CagA pozitivní a *Helicobacter pylori* CagA-negativní ve vzorcích odebraných z tonzil a adenoidní tkáně. Cirakova studie detekovala kmen *Helicobacter pylori*



CagA pozitivní u 71 % vzorků. Cirak a spol. však analyzovali pouze 23 vzorků, z nichž 7 bylo pozitivních na záchyt *Helicobacter pylori*. Z těchto sedmi vzorků bylo *Helicobacter pylori* CagA pozitivních 5. Stejnou studii se také zabývali Bulunt a spol. (2006), kteří analyzovali 29 vzorků. Z těchto vzorků shledali *Helicobacter pylori* CagA pozitivními 17 vzorků, tedy 59 % vzorků CagA pozitivních. Výsledky studie E. Pavlíka a spol. (2007) se ztotožňují s výsledky naší studie, že *Helicobacter pylori* CagA-negativní je hlavním rizikovým faktorem vzniku patogenit v oblasti orofaryngu.

Publikace P. Lukeše a spol z roku 2012 (39) také potvrzuje teorii, že pro vznik patogenit v oblasti orofaryngu je významnější sérotyp CagA-negativní. Zároveň však uvádí, že ve své studii prokázal přítomnost *Helicobacter pylori* CagA-negativní v orofaryngu a *Helicobacter pylori* CagA pozitivní v gastrické mukóze u téhož pacienta, což ukazuje na možnost současné infekce dvěma různými typy *Helicobacter pylori*.

Nguyen a spol. ve své publikaci uvádí, že z posledních studií byla u tonzilárního karcinomu metodou PCR prokázána největší prevalence infekce HPV 16, který také označil jako patogenní faktor vzniku orofaryngeálního karcinomu. Souběžnou detekcí *Helicobacter pylori* a HPV ve vzorcích pacientů pomocí PCR jsme zjistili procentuální zastoupení *Helicobacter pylori* a HPV. *Helicobacter pylori* byl zachycen u 71,05 % vzorků, zatímco HPV jen u 44,74 % vzorků pacientů trpících chronickými gastritidami. U pacientů trpících karcinomy tonsil, orofaryngu a slinných žláz byl *Helicobacter pylori* zachycen u 81,82 % vzorků, HPV pak u 54,55 % vzorků. Vzhledem k těmto statisticky významným rozdílům v procentuálním zastoupení *Helicobacter pylori* a HPV ve vyšetřovaných vzorcích lze vyvrátit teorii, že hlavním faktorem vzniku orofaryngeálního karcinomu jsou výlučně HPV 16 a připustit, že významným patogenem při vzniku tonsilitid a karcinomů tonsil a orofaryngu je *Helicobacter pylori*.

Zjištění, že HPV pravděpodobně působí i jako kofaktor *Helicobacter pylori* při vzniku chronických tonsilitid a orofaryngeálních karcinomů nás přimělo porovnat záchyt HPV u *Helicobacter pylori* CagA pozitivních vzorků a záchyt HPV u *Helicobacter pylori* CagA-negativních vzorků. Ve vzorcích se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-negativní byl výskyt HPV jen u 54,55 % těchto vzorků. Ve vzorcích chronických tonsilitid se záchytem *Helicobacter pylori* CagA pozitivní bylo detekováno jako HPV pozitivní 60 % vzorků. Rozdíl procentuálního zastoupení HPV ve vzorcích se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-negativní a ve vzorcích se záchytem *Helicobacter pylori* CagA pozitivní není v případě chronických tonsilitid statisticky významný. V případě orofaryngeálních karcinomů byl však tento rozdíl podstatně významnější. Ve vzorcích se záchytem *Helicobacter pylori* CagA-negativní bylo detekováno 76,47 % vzorků, zatímco ve vzorcích *Helicobacter pylori* CagA pozitivní byl záchyt HPV pouze ve 30 % případů. Tyto výsledky poukazují na teorii, že rizikovým faktorem vzniku orofaryngeálních karcinomů je jak *Helicobacter pylori* CagA-negativní, tak HPV, které působí jako kofaktor patogenity v oblasti orofaryngu.

Ve vzorcích kontrolní skupiny byl záchyt *Helicobacter pylori* prokázán u 12,9 % vzorků a HPV u 48,39 % vzorků, zatímco ve vzorcích pacientů s chronickými tonsilitidami byl *Helicobacter pylori* detekován u 71,05 % případů a HPV u 44,74 % případů. Ve vzorcích pacientů trpících orofaryngeálními karcinomy byl *Helicobacter pylori* zachycen u 81,82 % vzorků, zatímco HPV byly prokázány u 54,55 % vzorků.

Procento výskytu *Helicobacter pylori* ve vzorcích kontrolní skupiny, tedy skupiny vzorků pacientů bez příznaků onemocnění, bylo stanoveno na 12,9 %. V porovnání s výskytem *Helicobacter pylori* ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami, který činí 71,05 % je zřejmé, že *Helicobacter pylori* hraje

významnou roli při vzniku tohoto onemocnění. Při porovnání záchyty HPV v kontrolní skupině (48,39 %) a ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami (44,74 %) je procentuální rozdíl statisticky nevýznamný. Vzhledem k výrazně vyššímu záchytu HPV (48,39 %) oproti záchytu *Helicobacter pylori* (12,9 %) ve vzorcích kontrolní skupiny a vzhledem k nevýznamnému rozdílu výskytu HPV ve vzorcích kontrolní skupiny (48,39 %) a ve vzorcích chronických tonsilitid (44,74 %), lze usuzovat, že přítomnost HPV v orofaryngu bez přítomnosti *Helicobacter pylori* nemusí působit jako patogenní faktor vzniku onemocnění. Procentuální rozdíl výskytu *Helicobacter pylori* ve vzorcích kontrolní skupiny (12,9 %) a ve vzorcích pacientů trpících orofaryngeálními karcinomy (81,82 %) je ještě významnější, než tomu bylo u chronických tonsilitid. Naproti tomu procenta výskytu HPV ve vzorcích kontrolní skupiny (48,39 %) a ve vzorcích pacientů trpících orofaryngeálními karcinomy (54,55 %) jsou téměř shodná, což jen potvrzuje domněnku, že výskyt pouze HPV v oblasti orofaryngu nepůsobí patogenně. Téměř srovnatelné procento výskytu *Helicobacter pylori* u chronických tonsilitid (71,05 %) a orofaryngeálních karcinomů (81,82 %) a taktéž procento výskytu HPV ve vzorcích chronických tonsilitid (44,74 %) a ve vzorcích orofaryngeálních karcinomů (54,55 %) nabízí hypotézu, že obdobně jako gastritidy přecházejí do stádia gastrických karcinomů, z chronických tonsilitid vznikají v pozdějším stádiu karcinomy. Pro potvrzení této hypotézy je však třeba provést několik dalších studií.

V naší studii bylo pomocí genotypizace zjištěno zastoupení skupin HPV ve vyšetřovaných vzorcích. U vzorků chronických tonsilitid se nejčastěji vyskytovala skupina HPV A5+A6, která zahrnuje HPV 16, 18, 31, 33, 45, 51, 53, 56, 66, a 82. Skupina HPV A5+A6 byla ve vzorcích chronických tonsilitid detekována u 18,42 % případů. A5+A6, A7 (HPV 18 nebo 45) byla detekována u 15,79 % vzorků a vzorky bez záchyty HPV představovaly 55,26 %. Ve vzorcích pacientů s karcinomy činilo zastoupení A5+A6 skupiny 27,27 %. Současné zastoupení

A5+A6 a A7 a A5+A6 a A9 (HPV 16 nebo 31 nebo 33) u této skupiny činilo 9,09 %. Procento vzorků bez záchytu HPV bylo 45,45 %. Přítomnost HPV 16 byla zjištěna u většiny HPV pozitivních vzorků. Ačkoliv byly pro genotypizaci použity vysoce specifické sondy, díky shodným částem sekvencí HPV 16 a 18 nebylo možné tyto genotypy rozlišit. Možná přítomnost dalších genotypů v detekovaných skupinách HPV však vyvrací teorii, že chronické tonsilitidy a orofaryngeální karcinomy jsou způsobeny především HPV 16. Naše studie prokázala, že vznik těchto onemocnění je zapříčiněn nejen HPV 16, ale i dalšími typy vysoce rizikových HPV. Naší studií jsme tedy vyvrátili tvrzení Nguyena a spol.

Ve vzorcích kontrolní skupiny byl záchyt *Helicobacter pylori* u 12,9 % vzorků a HPV u 48,39 % vzorků, zatímco ve vzorcích pacientů s chronickými tonsilitidami byl *Helicobacter pylori* detekován u 71,05 % případů a HPV u 44,74 % případů. Ve vzorcích pacientů trpících orofaryngeálními karcinomy byl *Helicobacter pylori* zachycen u 81,82 % vzorků a HPV byly prokázány u 54,55 % vzorků.

Tuto hypotézu potvrzují také výsledky genotypizace *Helicobacter pylori* u pacientů trpících chronickými tonsilitidami a u pacientů trpících orofaryngeálními karcinomy. Nejčastěji vyskytujícím se genotypem ve vzorcích orofaryngeálních karcinomů je genotyp CagA-vacAs1bm2, který se v těchto vzorcích vyskytuje ve 29,63 % případů. Ve vzorcích chronických tonsilitid je sice prvním nejčastěji se vyskytujícím genotypem genotyp CagA-VacAs1am2, a to ve 22,22 %, avšak druhým nejčastěji se vyskytujícím genotypem je právě genotyp CagA-vacAs1bm2, který je zastoupen u 18,52 % vzorků. Procentuální rozdíl mezi prvním a druhým nejčastěji se vyskytujícím genotypem ve vzorcích chronických tonsilitid není statisticky významný. Pro potvrzení této hypotézy je však třeba provedení několika dalších studií.

## 7 ZÁVĚR

*Helicobacter pylori* a HPV jsou infekční agens, způsobující nejen záněty, ale především maligní onemocnění, která mohou při absenci léčby vést až k exitu pacienta. Všeobecné povědomí o existenci těchto agens a jejich další studie jsou tedy více než důležité.

V praktické části bakalářské práce jsme pomocí metody real-time PCR zkoumali výskyt *Helicobacter pylori* a HPV ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami a karcinomy orofaryngu.

*Helicobacter pylori* byl u pacientů s chronickými tonsilitidami zachycen u 27 případů z 38 vyšetřovaných vzorků, tedy v 71,05 % případů. Výskyt HPV byl v této skupině prokázán v 17 z 38 vyšetřovaných vzorků, tedy ve 44,74 % případů. Ve vzorcích pacientů trpících karcinomy orofaryngu se *Helicobacter pylori* vyskytoval v 81,82 % případů, tedy ve 27 z celkem 33 vyšetřovaných vzorků. HPV byly v této skupině zachyceny u 54,55 % vzorků, tedy u 18 ze 33 testovaných vzorků.

Poté co byly výsledky těchto dvou skupin porovnány s kontrolní skupinou jsme dospěli k závěru, že námi stanovené hypotézy jsou pravdivé. *Helicobacter pylori* a HPV jsou rizikovým faktorem vzniku chronických tonsilitid a orofaryngeálních karcinomů, přičemž HPV pravděpodobně působí jako kofaktor při rozvoji těchto onemocnění.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPV – humánní papilomavirus

PCR – polymerázová řetězová reakce

MALT – mucosa associated lymphoid tissue

WHO – Světová zdravotnická organizace

GIT – gastrointestinální trakt

VacA – vakuolizační toxin A

CagA – cytotoxin-associated gen A

ATPáza – adenosintrifosfatáza

ATP – adenosintrifosfát

NHL – Non-Hodgkingův lymfom

NK-buňky – natural killer buňky

DLBCL – difúzní velký B-buněčný lymfom

NKTCL – NK/T-lymfom nosního typu

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouvláknová DNA (double-stranded)

ssDNA – jednořetězová DNA (single-stranded)

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

pRB – protein retinoblastomu

E6-AP – E6-associated protein

CKD – cyklin-dependentní kináza

E2F – E2 faktor

OPSCC – orofaryngeální spinocelulární karcinom

HNSCC – karcinomy hlavy a krku

RNA – ribonukleová kyselina

RNáza – ribonukleáza

UV – ultrafialové záření

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát

FRET-sonda – Fluorescence Resonance Energy Transfer

ml – mililitr

$\mu$ l – mikrolitr

NA – nukleová kyselina

Real-TM – real-time

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) HOUGHTON, Jeanmarie: *Helicobacter species: methods and protocols*. New York: Humana Press, c2012. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 921. ISBN 978-1-62703-004-5.
- (2) YAMAOKA, Yoshio: *Helicobacter pylori: molecular genetics and cellular biology*. Wymondham: Caister Academic, c2008. ISBN 978-1-904455-31-8.
- (3) Helicobacter Pylori: Microbiology, Infection and Treatment. *Microscope Master* [online]. [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://www.microscopemaster.com/helicobacter-pylori.html>
- (4) SCHINDLER, Jiří: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- (5) FOEGEDING, Nora J., Rhonda R. CASTON a Mark S. MCCLAIN: *An Overview of Helicobacter pylori VacA Toxin Biology*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2016, 1 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.3390/toxins8060173. 27271669. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926140/>
- (6) HATAKEYAMA, Masanori: Helicobacter pylori CagA- a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. *Int. J. Cancer* [online]. Japan, 2006, (1217-1223), 7 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.21831>
- (7) TAN, Leonard HC: Lymphomas Involving Waldeyer's Ring: Placement, Paradigms, Peculiarities, Pitfalls, Patterns and Postulates. *Annals Academy of Medicine* [online]. Singapore, 2004, (4), 12 [cit. 2020-04-06]. 119074. Dostupné z: <http://annals.edu.sg/pdf200409/V33N4p15S.pdf>
- (8) BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA: *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
- (9) HELLINGS, P., M. JORISSEN a JL CEUPPENS: *The Waldeyer's ring*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2000 [cit. 2020-04-06]. 11082757. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082757?fbclid=IwAR27PIUtDQCpv8PAWwvvgxC40JjmdtXvMNkyDEHvmTa9eIthUEnyoWootobg>



- (10) SCADDING, Glenis K: Immunology of the Tonsil: A Review. *Journal of the Royal Society of Medicine* [online]. 1990, 4 [cit. 2020-04-06]. 0141-0768/90/020104-04. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/014107689008300216>
- (11) DEL PILAR QUIÑONES-AVILA, Maria, Abel A. GONZALEZ-LONGORIA, Joan H. ADMIRAND a et al: Hodgkin Lymphoma Involving Waldeyer Ring: A Clinicopathologic Study of 22 Cases. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 2005, (123), 6 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1309/33YCNMW08KNA36NT. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcp/article/123/5/651/1759474>
- (12) PATRASCU, Ana Maria, Ionela ROTARU a Valeriu SURLIN et al: *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* [online]. 2019, 12 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.5772/intechopen.85489. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/332174669\\_Diffuse\\_Large\\_B-Cell\\_Lymphoma](https://www.researchgate.net/publication/332174669_Diffuse_Large_B-Cell_Lymphoma)
- (13) AOZASA, Katsuyuki, Tetsuya TAKAKUWA a Tadashi HONQYO et al: Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. *Springer link* [online]. 8. 2008 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-008-0021-7>
- (14) NAKAMURA, Shotaro a Takayuki MATSUMOTO: *Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Recent progress in pathogenesis and management*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2013, 1 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.3748/wjg.v19.i45.8181. 24363507. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857439/#B19>
- (15) ZULLO, Angelo, Cesare HASSAN a Francesca CRISTOFARI: *Gastric low-grade mucosal-associated lymphoid tissue-lymphoma: Helicobacter pylori and beyond*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2010, 1 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.4251/wjgo.v2.i4.181. 21160595. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2998825/>
- (16) NGUYEN, N.P., A. CHI a B.H. LY et al: *Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: a new clinical entity* [online]. 2010, 8 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1093/qjmed/hcp176. Dostupné z: <https://academic.oup.com/qjmed/article/103/4/229/1568856>
- (17) IARC Working group: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 90. Lyon, Francie, s. 1 [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>

- (18) WHO HPV Laboratory Network: Human Papillomavirus. *World Health Organization* [online]. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: [https://www.who.int/biologicals/areas/human\\_papillomavirus/en/](https://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/en/)
- (19) YIM, Eun-Kyoung a Jong-Sup PARK: *The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2005, 1 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.4143/crt.2005.37.6.319. 19956366. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785934/>
- (20) NGUYEN, N.P., A. CHI a L.M. NGUYEN: Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: a new clinical entity. *An International Journal of Medicine* [online]. 2010, 8 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1093/qjmed/hcp176. Dostupné z: <https://academic.oup.com/qjmed/article/103/4/229/1568856>
- (21) HPV infekce a lidský papilomavirus. *ProLékaře.cz* [online]. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: [https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/hpv-infekce-a-lidsky-papilomavirus-128/hpv\\_infekce\\_a\\_lidsky\\_papilomavirus-125](https://www.prolekare.cz/kreditovane-kurzy/hpv-infekce-a-lidsky-papilomavirus-128/hpv_infekce_a_lidsky_papilomavirus-125)
- (22) PRŮBĚH HPV INFEKCE. *HPVINFO.cz* [online]. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <http://hpvinfo.cz/prubeh-HPV-infekce>
- (23) Průběh HPV infekce. *Hpvguide* [online]. [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <https://www.hpvguide.eu/teorie/prubeh-hpv-infekce>
- (24) PEŘINA, Vojtěch, Jiří BLAHÁK a Oliver BULIK: Karcinomy hlavy a krku – vlivy HPV infekce. *LKS* [online]. 19. 2015, 1 [cit. 2020-04-12]. ISSN 1210-3381. Dostupné z: <http://www.lks-casopis.cz/clanek/karcinomy-hlavy-a-krku-vlivy-hpv-infekce/>
- (25) ELREFAEY, S., M.A. MASSARO a S. CHIOCCA et al: *HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2014, 1 [cit. 2020-04-12]. 25709145. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4299160/>
- (26) YOU, E.L., M. HENRY a A.G. ZEITOUNI: *Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management*. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2019, 1 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.3747/co.26.4819. 31043814. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6476447/>

- (27) Očkování adolescentů proti HPV infekci. *Hpvcollege* [online]. [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: [https://www.hpv-college.cz/ockovani-13-letych-proti-hpv-infekci?fbclid=IwAR3\\_2I\\_iDKNFUyAyq3jcYzqYNwAhzeSLxrE-VbTp2\\_ACGoW2O9sheB30Lpo](https://www.hpv-college.cz/ockovani-13-letych-proti-hpv-infekci?fbclid=IwAR3_2I_iDKNFUyAyq3jcYzqYNwAhzeSLxrE-VbTp2_ACGoW2O9sheB30Lpo)
- (28) *Gardasil 9* [online]. Praha: MSD, 2020 [cit. 2020-04-14]. Dostupné z: <https://ockovaniprothpv.cz/gardasil-9>
- (29) GUPTA, Nalini: *DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. US National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. 2019, 1 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.4103/JOC.JOC\_110\_18. 30992648. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425773/>
- (30) BERÁNEK, Martin: *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
- (31) PAVLÍK, Emil: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 5. *Labor Aktuell*. Praha: Roche. s.r.o., Diagnostics Division, 1999(4), 4. ISSN 1214-7672.
- (32) PAVLÍK, Emil: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 3. *Labor Aktuell*. Praha: Roche s.r.o., Diagnostics Division, 1999(2), 4. ISSN 1214-7672.
- (33) PAVLÍK, Emil: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 11. *Labor Aktuell*. Praha: Roche s.r.o., Diagnostics Division, 2004(3), 4. ISSN 1214-7672.
- (34) ENGSTROM-MELNYK, Julia, Pedro L. RODRIGUEZ a Olivier PERAUD: Chapter 5 - Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Methods in Microbiology* [online]. 2015, 37 [cit. 2020-04-14]. ISSN 0580-9517. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951715000069>
- (35) PAVLÍK, Emil: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 2. *Labor Aktuell*. Praha: Roche s.r.o., Diagnostics Division, 1999(1), 4. ISSN 1214-7672.
- (36) VAN DOORN, LJ, C FIGUEIREDO, F MEGRAUD a et al: Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1999, 116, 4: 823-830.

- (37) ENGLEBERG, N. Cary, Victor DIRITA a Terence S. DERMODY: *Mechanisms of Microbial Disease*. 5. Lippincott Williams and Wilkins, 2012. ISBN 1451100051.
- (38) PAVLÍK, E., P. LUKEŠ, B. POTUŽNÍKOVÁ a et al: Helicobacter pylori isolated from patients with tonsillar cancer or tonsillitis chronica could be of different genotype compared to isolates from gastrointestinal tract. *Folia Microbiol.* Praha, 2007, 52(1): 91-94.
- (39) LUKEŠ, P., E. PAVLÍK, B. POTUŽNÍKOVÁ a et al: Comparison of Helicobacter Pylori Genotypes Obtained from the Oropharynx and Stomach of the Same Individuals – A Pilot Study. *Prague Medical Report*. Praha, 2012, 3(113), 9. ISSN 1214-6994.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Schéma buněčné vakuolizace indukovaná cytotoxinem VacA (2)	16
<b>Obrázek 2</b> Působení VacA toxinu na buňky gastrické mucosy a imunitní buňky (2)	18
<b>Obrázek 3</b> Schéma mechanismu působení E6 a E7 na buněčný cyklus (24)	25
<b>Obrázek 4</b> Schéma automatizované izolace (31)	32
<b>Obrázek 5</b> Schéma jednoho cyklu real – time PCR (34)	36
<b>Obrázek 6</b> Analyzátor MagNA Pure Compact pro izolaci nukleových kyselin (vlastní zdroj)	38
<b>Obrázek 7</b> Kazeta s reagensy pro izolaci nukleové kyseliny (vlastní zdroj)	38
<b>Obrázek 8</b> Pracovní prostor izolátoru připravený pro zahájení izolace (vlastní zdroj)	39
<b>Obrázek 9</b> Hotové vzorky připravené k další analýze (vlastní zdroj)	39
<b>Obrázek 10</b> Rotor s napipetovanými vzorky nukleových kyselin před zajištěním a po zajištění (vlastní zdroj)	40
<b>Obrázek 11</b> Rotor umístěný v analyzátoru před spuštěním vlastní analýzy (vlastní zdroj)	41
<b>Obrázek 12</b> Procentuální vyjádření výskytu <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve všech vzorcích kontrolní skupiny	45
<b>Obrázek 13</b> Procentuální zastoupení vzorků bez záchyty <i>Helicobacter pylori</i> a prokázanými CagA+ a CagA- <i>Helicobacter pylori</i> ve vzorcích kontrolní skupiny	45
<b>Obrázek 14</b> Procentuální zastoupení skupin HPV ve vzorcích kontrolní skupiny	46
<b>Obrázek 15</b> Procentuální vyjádření výskytu <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve všech vzorcích pacientů testovaných na chronické tonsilitidy	50

<b>Obrázek 16</b> Procentuální zastoupení vzorků bez záchyty <i>Helicobacter pylori</i> a prokázanými CagA+ a CagA- <i>Helicobacter pylori</i> ve vzorcích pacientů testovaných na chronické tonsilitidy .....	50
<b>Obrázek 17</b> Procentuální zastoupení skupin HPV ze vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami .....	51
<b>Obrázek 18</b> Procentuální vyjádření výskytu <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve všech vzorcích pacientů testovaných na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz .....	55
<b>Obrázek 19</b> Procentuální zastoupení vzorků bez záchyty <i>Helicobacter pylori</i> a CagA+ a CagA- ve vzorcích pacientů testovaných na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz.....	55
<b>Obrázek 20</b> Procentuální zastoupení skupin HPV ze vzorků pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz .....	56
<b>Obrázek 21</b> Procentuální zastoupení <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve vzorcích kontrolní skupiny a ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami...	57
<b>Obrázek 22</b> Procentuální zastoupení <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve vzorcích kontrolní skupiny a ve vzorcích pacientů trpících karcinomy.....	58
<b>Obrázek 23</b> Procentuální zastoupení <i>Helicobacter pylori</i> a HPV ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami a ve vzorcích pacientů trpících karcinomy .....	58
<b>Obrázek 24</b> Procentuální zastoupení genotypů <i>Helicobacter pylori</i> ve vzorcích kontrolní skupiny .....	59
<b>Obrázek 25</b> Procentuální zastoupení genotypů <i>Helicobacter pylori</i> ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami.....	61
<b>Obrázek 26</b> Procentuální zastoupení genotypů <i>Helicobacter pylori</i> ve vzorcích pacientů trpících karcinomy.....	63

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Výsledky vzorků kontrolní skupiny pacientů .....	43
<b>Tabulka 2</b> Záchyt <i>Helicobacter pylori</i> a humánních HPV ve vzorcích kontrolní skupiny.....	44
<b>Tabulka 3</b> Výskyt CagA v <i>Helicobacter pylori</i> pozitivních vzorcích kontrolní skupiny.....	45
<b>Tabulka 4</b> Genotypizace HPV ze vzorků pacientů kontrolní skupiny .....	46
<b>Tabulka 5</b> Výsledky vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami....	47
<b>Tabulka 6</b> Záchyt <i>Helicobacter pylori</i> a humánních HPV ve vzorcích pacientů s chronickými tonsilitidami.....	48
<b>Tabulka 7</b> Výskyt Cag A v <i>Helicobacter pylori</i> pozitivních vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami.....	49
<b>Tabulka 8</b> Genotypizace HPV ze vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami.....	51
<b>Tabulka 9</b> Výsledky vzorků pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz.....	52
<b>Tabulka 10</b> Záchyt <i>Helicobacter pylori</i> a humánních HPV ve vzorcích pacientů s karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz.....	53
<b>Tabulka 11</b> Výskyt CagA v <i>Helicobacter pylori</i> pozitivních vzorcích pacientů trpících karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz .....	54
<b>Tabulka 12</b> Genotypizace HPV ze vzorků pacientů trpících na karcinomy orofaryngu, tonsil nebo slinných žláz.....	56
<b>Tabulka 13</b> Přehled procentuálního zastoupení <i>Helicobacter pylori</i> CagA+ a Cag A- a HPV v jednotlivých testovaných skupinách.....	57
<b>Tabulka 14</b> Genotypizace <i>Helicobacter pylori</i> a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích kontrolní skupiny .....	59
<b>Tabulka 15</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních ve vzorcích kontrolní skupiny se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA- .....	59

<b>Tabulka 16</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních ve vzorcích kontrolní skupiny se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA+.....	60
<b>Tabulka 17</b> Genotypizace <i>Helicobacter pylori</i> a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích pacientů trpících chronickými tonsilitidami.....	60
<b>Tabulka 18</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA- .....	61
<b>Tabulka 19</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících chronickými tonsilitidami se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA+.....	61
<b>Tabulka 20</b> Genotypizace <i>Helicobacter pylori</i> a záchyt HPV u jednotlivých genotypů ve vzorcích pacientů trpících karcinomy .....	62
<b>Tabulka 21</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících karcinomy se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA-...	63
<b>Tabulka 22</b> Procentuální zastoupení HPV pozitivních a HPV negativních vzorků pacientů trpících karcinomy se záchytem <i>Helicobacter pylori</i> CagA+ ..	63