

VLIV HELICOBACTER PYLORI NA ŽALUDEČNÍ KANCEROGENEZI

THE ROLE OF HELICOBACTER PYLORI IN GASTRIC CANCER

ŠACHLOVÁ M., KOUKALOVÁ H., KAPIČKOVÁ M.*, ŠTĚPÁNIKOVÁ O.*

KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE – MOŮ BRNO
*BIO PLUS s. r. o., IMUNOLOGICKÁ LAB., BRNO

Souhrn: Na základě řady studií byl *Helicobacter pylori* uznán za karcergen I. třídy. Vztah mezi HP a karcinomem je však zatížen mnoha problémy. Kmeny HP podle schopnosti produkovat cytotoxiny můžeme rozdělit na skupinu produkující vakuolizační toxin Vac A a protein vázaný na cytotoxin Cag A (souhrnně označeno jako kmeny I) a na skupinu neprodukující cytotoxiny (kmeny II). Jsou přesvědčivé doklady o tom, že kmeny typu I mají dominantní úlohu při rozvoji zánětu. Vyšetřili jsme protilátky proti HP metodou Elisa a western blot v souboru 65 pacientů s karcinomem žaludku a u kontrolního souboru (35 osob). Prokázali jsme statisticky významně vyšší prevalenci protilátek proti invazivním kmenům HP u pacientů s karcinomem žaludku než u kontrolního souboru. Statisticky významný rozdíl v prevalenci protilátek proti agresivním kmenům HP ve vztahu k lokalizaci nádoru a k histologickému typu karcinomu se prokázat nepodařilo. Tento výsledek je pravděpodobně ovlivněn malým počtem pacientů v souboru. Přesto se zdá, že kmeny produkující cytotoxiny mají z hlediska patogeneze svůj význam. Pokud víme, v české odborné literatuře nebyl podobný soubor dosud publikován.

Klíčová slova: *Helicobacter pylori*, karcinom žaludku, Vac A a Cag A protein, protilátky

Abstract: Based on the wide range of studies, *Helicobacter pylori* was declared to be a 1st class cancerogenic agent. However, the association between HP and gastric cancer is not so clear. Based on their cytokine production, the HP strains can be divided into two groups: the strains producing vacuolating toxin Vac A and cytotoxin Cag A bound protein (group I) and the strains not producing cytotoxins (group II). There are compelling evidences of the dominant role of the group I strains in the gastritis development. Using Elisa and western blot methods, we explored HP antibodies in the sample of gastric cancer patients (n=65) and controls (n=35). Compared with the controls, there is significantly higher prevalence of invasive HP strains antibodies in the samples of the cancer patients. We failed to detect the statistically significant association between the prevalence of the aggressive HP strains antibodies and the localization of the carcinoma or histological type, respectively. These findings are likely influenced by a small number of patients in the study. Nevertheless, the strains producing cytotoxins may be considerable for the pathogenesis. As far as we know, no similar study has been published in the Czech literature.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric carcinoma, Vac A protein, Cag A protein, antibodies

Výskyt karcinomu žaludku

V celosvětovém měřítku je karcinom žaludku jednou z nejčastějších malignit. Ročně je zaznamenáno 700 000 nových případů. Úmrtnost na karcinom žaludku je v přepočtu na světový standard nejvyšší v Ruské federaci (37,5 na 100 000), následují Kazachstán (33,9 na 100 000), Chile (32,2 na 100 000) a Japonsko (30,7 na 100 000). Nejnižší úmrtnost na toto onemocnění je v USA (6,3 na 100 000) (WHO Mortality Database-1995).

V ČR byl v roce 1999 karcinom žaludku nově diagnostikován u 1071 mužů (21,4 na 100 000) a u 797 žen (15,1 na 100 000). Na tuto diagnózu zemřelo 859 mužů (17,2 na 100 000) a 679 žen (12,9 na 100 000). V průběhu let dochází u nás k trvalému poklesu výskytu karcinomu žaludku - v období 1960-1992 se výskyt snížil o 50%.

Histologické typy karcinomu žaludku

Je nepochybné, že zhoubný nádor žaludku nemá jedinou příčinu. Z řady ukazatelů je dokonce pravděpodobné, že není jedním onemocněním. Pro tuto úvahu svědčí např. existence dvou odlišných histologických typů. (12)

U intestinálního typu je východiskem intestinálně metaplastický žaludeční epitel. Prekancerózou je jednak atrofická gastritida a intestinální metaplazie, ale také adenomy a dysplazie. (19) Tento typ postihuje osoby starší, při jeho vzniku mají zřejmě vliv faktory zevního prostředí, především infekce HP a dietní vlivy. Pokles ve výskytu karcinomu se týká právě tohoto typu.

Difúzní typ nevychází z metaplazie, postihuje mladší osoby bez rozdílů pohlaví. Nežádá vzniká bez výraznější gastritidy.

dy. Ve světě se vyskytuje zhruba rovnoměrně, nemění se s migrací obyvatelstva. Nositelé krevní skupiny A mají asi o 20% vyšší pravděpodobnost onemocnět nádorem žaludku tohoto typu než nositelé jiných krevních skupin. Nověji se ukazuje, že infekce HP je rizikovým faktorem pro vznik karcinomu žaludku difúzního typu i u mladších osob (pod 45 let). Prognóza je u tohoto typu horší než u typu intestinálního. Existují též typy přechodné či nezařaditelné.

Důležitým mikroskopickým hlediskem je i celulizace stromatu nádoru. Zřetelná mononukleární buněčná infiltrace, ukazující na imunologickou reakci, svědčí o lepší prognóze.

Vlivy zevního prostředí

Při vzniku nádoru žaludku hraje důležitou roli nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny, nadbytek soli, přepalovaných tuků, alkoholu a kouření. Kouření hraje roli při rozvoji atrofické gastritidy a intestinální metaplazie. (15) Jako jedna z možných příčin poklesu nádoru žaludku se uvádí i změna způsobu skladování potravin, zejména chlazení a mražení, které omezilo rozvoj bakteriální a mykotické kontaminace potravy a působení toxinů tohoto původu (např. aflatoxiny, N-nitrozové sloučeniny). (24)

Nitrozové sloučeniny indukují vznik karcinomu u 40-ti druhů experimentálních zvířat, nitrity a nitráty chápeme jako prekursorů těchto karcergenů. (12) Škodlivě mohou působit i karcerogeny obsažené v uzených jidelech.

Jako ochranné faktory působí antioxidanty vitamin C a beta karoten. Z normálních složek potravy mají protektivní vlastnosti čerstvé ovoce a zelenina, mléko a mléčné produkty a vláknina.

Genetické vlivy

U karcinomu žaludku nebyla zjištěna jediná dominující alterace v genetické výbavě. Předpokládá se souhrn mnohačetných abnormalit. Jsou zjištěny aktivace onkogenů (ras) a ztráty alel nádory potlačujících genů, především p53 (chromozom 17p), APC (chromozom 5q) a DCC gen (chromozom 18q). (23)

Genetické vlivy jsou ve hře patrné u difuzního karcinomu (viz výše).

Příbuzní I. stupně nemocného s rakovinou žaludku mají přibližně 2-3x větší riziko onemocnění. Jsou známy rodiny, kde se karcinom žaludku vyskytuje v několika generacích. Studie postižených dvojčat referují o vysoké konkordanci. Rakovina žaludku se vyskytuje často jako součást Lynchova syndromu II. (12)

Helicobacter pylori (HP)

Objev HP výrazně změnil dosavadní pohled na patogenезi vředové choroby, gastritidy a do značné míry i karcinomu a lymfomu žaludku. Na základě řady studií vyhlásila International Agency for Research on Cancer v roce 1994 *Helicobacter pylori* za kancerogen I. třídy.

Helicobacter pylori je nesporeující gramnegativní tyčinka opatřená na konci třemi až čtyřmi pohyblivými bičíky (vzácně jsou mikroorganismy bez bičíků), vyžadující pro svůj růst mikroaerofilní prostředí. Nesmírně důležité jsou biochemické vlastnosti bakterie, především produkce ureázy, katalázy, oxidázy, alkoholdehydrogenázy a peroxidismutázy.

Po požití bakterie překoná HP baktericidní aktivitu žaludečního lumenálního obsahu a vstoupí do hlenové vrstvy. HP se nachází pouze na povrchu žaludeční sliznice a nedochází k průniku do jejích hlubokých vrstev. Produkci ureázy hydrolyzuje endogenní ureu na bikarbonát a amoniak, který mění pH v bezprostředním okolí mikroba a dovoluje přežít HP v kyselém prostředí. (2)

Helikobakterová gastritida může vést ke vzniku atrofické gastritidy, vyvíjí se intestinální metaplazie s možným rozvojem dysplastických změn. Je však pravděpodobné, že významné jsou především regenerační děje. Buněčná proliferace, kterou se reparují slizniční léze, zvyšuje pravděpodobnost mylné replikace genetické informace pod vlivem mutagenů působících ze zevního prostředí. Někteří autoři dávají proliferaci buněk do souvislosti s produkcí amoniaku pomocí ureázy HP.

K narušení přirozených cytoprotektivních mechanismů vedou proteolytické enzymy, schopné degradovat žaludeční hlen. Kmeny HP podle schopnosti produkovat cytotoxiny můžeme rozdělit na skupinu produkující vakuolizační toxin Vac A a protein vázaný na cytotoxin Cag A, souhrnně označenou jako skupinu I a na skupinu neprodukující cytotoxiny jako kmeny II. Jsou přesvědčivé doklady o tom, že kmeny typu I mají dominantní úlohu při rozvoji zánětu. Bylo prokázáno, že až 70% všech kmenů HP je Cag A pozitivních. (3)

Kouření osob s CagA+ HP infekcí statisticky významně zvyšuje riziko nádoru žaludku. (4)

Vac A se váže na membrány epiteliálních buněk a vytváří kanál, kterým mohou procházet bikarbonáty a organické anionty. Není vyloučeno, že zajišťuje také nutriční potřeby mikroba. Vac A se váže na mitochondrie, kde způsobuje uvolnění cytochromu C a indukuje apoptózu. (2) V západních zemích jsou některé varianty Vac A spojeny s těžkými formami chronické gastritidy, podobná asociace nebyla potvrzena v Asii. Nověji byl nalezen další faktor, označený jako Oip A (outer inflammatory protein), mající schopnost iniciovat lokální zánětlivou reakci. (26) *Helicobacter pylori* obsahuje i významné množství superoxid dismutázy a katalázy, které mají výrazný protektivní účinek proti oxidativním substancím, jež jsou v místě zánětu uvolňovány. (8)

Zánětlivá odpověď je založena na reakci neutrofilů, T a B lymfocytů, plazmatických buněk, makrofágů, žírných buněk spo-

lečně s postižením epiteliálních buněk, kde může vyvolat apoptózu. Apoptóza epiteliálních buněk je způsobena jednak přímým efektem mikroba, jednak nepřímou imunitní odpovědí zprostředkovanou Fas ligandy T lymfocytů a Fas receptory žaludečních epiteliálních buněk. Žaludeční epitel infikovaných osob obsahuje zvýšené množství interleukinu 1 beta, interleukinu-2, interleukinu -6 a tumor necrosis faktoru-alfa. Významnou roli má interleukin-8, který aktivuje chemotaxi neutrofilních leukocytů. HP indukuje mohutnou systémovou a slizniční odpověď. Protilátková odpověď namířená proti H+/K+ ATP-áze žaludečních parietálních buněk koreluje s atrofií žaludeční sliznice. T buňky se podílejí na slizniční ochraně a pomáhají odlišit patogenní kmeny od komenzářů. Poškození epiteliálních buněk může být vyvoláno volnými kyslíkovými radikály (17). Chronický zánět zvyšuje obnovu epiteliálních buněk a apoptózu. Pozánětlivý polymorfismus interleukinu 1 beta podporuje gastritidu predominantně v těle žaludku a je spojena s hypochlorhydrií, atrofií a žaludečním karcinomem. (2)

Riziko karcinomu se zvyšuje, když infekce HP trvá od dětství a jedinec konzumuje stravu s potenciálními karcinogeny a na druhé straně přijímá málo antioxidantů v potravě. Nelze opomenout i vliv prostaglandinů. COX 2 je isoforma cyklooxygenázy, klíčový enzym pro syntézu prostaglandinů. Přítomnost HP zvyšuje expresi COX 1 a 2. COX 2 má vztah k neregulovanému růstu. Jeho inhibitor působí protektivně na ochranu sliznice a snižuje riziko nádorů.

Důležité jsou geny *helicobacteria pylori*, jejichž funkce může být suprimována nebo aktivována a které se podílí na mutagenезi.

Popis souborů

V souboru je zahrnuto 65 pacientů s karcinomem žaludku, z toho 34 mužů s věkovým průměrem 59 let (rozpětí 39-74 let) a 31 žen s věkovým průměrem 56 let (rozpětí 26-85 let). V souboru je 24 osob starších 60 let, proto jsme kromě celého souboru statisticky hodnotili ještě zvlášť podsoubor pacientů mladších 60 let.

Inoperabilní nález v celém souboru byl u 9 pacientů. Výskyt karcinomu žaludku u dalších členů rodiny uvádělo 7 pacientů. V minulosti se 8 pacientů léčilo pro vředovou chorobu.

Kontrolní skupina 35 osob je sestavena z 20 mužů a 15 žen. Jedná se o zcela zdravé osoby vyšetřované v rámci dárcovství krve a v rámci pravidelných preventivních prohlídek. Průměrný věk mužů je 42 let (rozpětí 18-45 let), průměrný věk žen je 51 let (rozpětí 18-55 let).

Materiál

Pro serologické vyšetření jsme použili krevní sérum vyšetřovaných osob.

Resekáty žaludku jsme znovu nehodnotili, ale pouze použili slovní popis histologického nálezu (pacienti byli operováni na různých pracovištích).

Metodika

1. Stanovení protilátek proti *H.pylori* bylo provedeno metodou ELISA. Byla použita diagnostická souprava Anti-H.Pylori, IgA, IgG a IgM Microplate ELISA firmy MONOBIND USA) s biotinylovaným celobuněčným antigenem.

Souprava obsahuje 5 kalibrátorů s deklarovaným obsahem protilátek a umožňuje kvantitativní hodnocení výsledků v UI/ml.

2. Detekce invazivních antigenů 120 CagA a 87 Vac A *H.pylori* byla provedena metodou western-blot (WB)-Immunoblot *H.pylori* IgA, IgG firmy MIKROGEN (Německo). Metoda dovoluje stanovení jednotlivých antigenních determinant *H.pylori*.

3. *Helicobacter pylori* nebyl hodnocen v resekátech žaludku s tumorem.

Výsledky

1. Muži s karcinomem žaludku (n = 34)

MUŽI	Elisa HP+/WB+	Elisa HP+/WB-	Elisa HP-/WB-	Elisa HP-/WB+
Difuzní	4	0	0	2
Intestinální	17	1	3	7
Nezařaditelný	0	0	0	0
Proximální	8	1	1	5
Distální	13	0	2	4
Celkem	21	1	3	9

2. Ženy s karcinomem žaludku (n = 31)

ŽENY	Elisa HP+/WB+	Elisa HP+/WB-	Elisa HP-/WB-	Elisa HP-/WB+
Difuzní	6	1	0	3
Intestinální	13	2	2	4
Nezařaditelný	1	0	0	1
Proximální	3	1	1	1
Distální	15	2	1	5
Celkem	19	3	2	7

3. Všichni pacienti s karcinomem žaludku (n = 65)

CELKEM	Elisa HP+/WB+	Elisa HP+/WB-	Elisa HP-/WB-	Elisa HP-/WB+
Difuzní	10	1	0	5
Intestinální	30	3	5	11
Nezařaditelný	1	0	0	1
Proximální	11	2	2	6
Distální	28	2	3	9
Celkem	40	4	5	16

Popis k tabulkám a grafům

Rozdělení nádorů žaludku:

- histologický typ: difuzní, intestinální nebo nebylo možné podle popisu určit
- lokalizace: spíše proximální nebo spíše distální (přesné rozlišení mnohdy nelze)

4. Kontrolní skupina (n = 35)

	Elisa HP+/WB+	Elisa HP+/WB-	Elisa HP-/WB-	Elisa HP-/WB+
Celkem	3	13	18	1

Fischerovým testem byl zhodnocen podíl HP pozitivních pacientů zjištěných v příslušných srovnávaných skupinách metodou western blot. Na hladině významnosti $P < 0,001$ jsme prokázali statisticky významný rozdíl ve výskytu cytotoxických kmenů u pacientů s karcinomem žaludku oproti kontrolnímu souboru.

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl podle lokalizace nebo histologického typu nádoru.

Srovnání pacientů s kontrolním souborem

	Podíl HP WB+ (%)	P	Sign.
Všichni pacienti s ca žaludku	86,15	< 0,001	**
Kontrola	11,43		
Pacienti s ca žaludku do 60 let	84,62 11,43	< 0,001	**
Lokalizace	podíl HP WB+ (%)		

Podle lokalizace nádoru

	Podíl WB+ (%)	P	Sign
Distální	88,10	0,466	
Proximální	80,95		

Podle histologického typu karcinomu

	Podíl WB+ (%)	P	Sign
Intestinální typ	93,75	0,433	
Difuzní	83,67		

Diskuse

Serologická diagnostika je nenáročná, ale prakticky nejméně přínosná. Převažuje hodnocení metodou ELISA se senzitivitou 92% a specificitou až 96%. Imunologická reakce organismu na infekci HP je však prokazatelná až se zpožděním několika týdnů a její pozitivita přetrvává i po úspěšné eradikaci více než 6 měsíců. Využívá se převážně v epidemiologických studiích.

Serologická metoda byla zvolena při zahájení studie asi před 5 lety, protože v té době nebylo běžně dostupné vyšetření dechovým testem a vyšetření antigenu *H. pylori* ve stolici.

Neinvasivní dechový test pomocí izotopu ^{13}C je jednoduchý, výsledky se hodnotí na analyzátorech - hmotnostních spektrofotometrech. Senzitivita je 92%, specificita 100%.

Detekce antigenu ze stolice je výhodná zejména u dětí a před zahájením léčby. Principem testu je vazba antigenů HP na polyklonální králičí anti-H protilátky a stanovení in vitro metodou ELISA. Hodnotí se vizuálně změna barvy nebo fotometricky.

Zdánlivě rozporné výsledky mezi ELISA metodou a WESTERN BLOTEM jsou způsobeny rozdílnou citlivostí metod - western blot má vyšší specificitu a senzitivitu.

ELISA stanovení je určeno pro screening - zjištění přítomnosti celkových protilátek v jednotlivých třídách Ig. V testu se prokazují protilátky proti celobuněčnému antigenu (včetně nespecifických antigenních determinant).

WESTERN BLOT (WB) se používá ke confirmaci výsledků získaných testem ELISA. Metoda dovoluje odlišit přítomnost protilátek proti jednotlivým antigenním epitopům, které jsou po skončení reakce zřetelně vybarveny na stripu. Dají se odlišit protilátky proti specifickým antigenním determinantům a vyloučit zkříženě reagující antigeny. Technicky je ošetřen tak, že lze prokázat stopová množství specifických antigenních determinant - WB má vyšší specificitu a senzitivitu než ELISA. (13)

V jednom případě v kontrolním souboru po oznámení nálezu protilátek HP proti agresivním kmenům byla přiznána dyspepsie.

Vztah mezi infekcí HP a karcinomem je zatížen mnoha problémy. Např. v Africe je vysoká prevalence HP (90%) a karcinom žaludku je přitom vzácný. Vysoká prevalence protilátek současně s nízkým výskytem karcinomu je též v Indii a Bangladéši (14). V USA výskyt karcinomu stále klesá, i když prevalence HP je v populaci poměrně vysoká (až 50%). Prevalence HP u mladých Japonců s žaludečním karcinomem je signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (22). Zvýšené riziko karcinomu žaludku u japonské populace s protilátkami proti HP prokázala studie provedená na souboru 10 234 osob (25). HP infikuje více než polovinu světové populace, ale jen u méně než 1% se vyvine malignita žaludku. (11)

Pro Českou republiku kolísají odhady prevalence HP mezi 50-70% (7,6,10). Při sledování epidemiologie výskytu HP je nutné znát zastoupení patogenních kmenů. (6) Prevalence u osob ve věku 20-29 let činila 54% a ve věku 50-59 let 79%. (10) V literatuře uváděná závislost prevalence na sociálně ekonomické úrovni je nezpochybnitelná. K získání reprezentativnějšího přehledu o skutečné prevalenci HP v České republice

jsou zapotřebí studie organizované dle jednotlivých regionů. (6) V našem souboru jsme prokázali statisticky významně vyšší zastoupení cytotoxických kmenů HP u pacientů s karcinomem žaludku než v kontrolním souboru. Stejně výsledky jsou uváděny v Chile, kde protilátky agresivních kmenů byly signifikantně vyšší u pacientů s duodenálním vředem a žaludečním karcinomem než u asymptomatických osob. (9) Oproti tomu prevalence Cag A nebo Vag A pozitivních kmenů (agresivní kmeny HP) je relativně vysoká v zemi s nízkou incidencí žaludečního karcinomu. (1)

Riziko obou histologických typů nádorů se zvyšuje přítomností HP infekce. Více než 80% nádorů žaludku je spojováno s infekcí HP. (5) *Helicobacter pylori* predominantně osidluje antrum, ale např. dle studie autora Pereira nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v histologickém typu nádoru. (18) V naší práci jsme rovněž nenašli statisticky významný rozdíl ve výskytu agresivních kmenů HP u difúzního nebo intestinálního typu karcinomu žaludku.

Difúzní typ karcinomu je stejně častý u mužů jako u žen a vyskytuje se častěji v těle žaludku a fundu než IGCA. (19) V našem souboru je pouze 6 mužů a 10 žen s karcinomem difúzního typu, proto nemůžeme zhodnotit význam pohlaví v našem souboru.

Intestinální typ karcinomu se vyskytuje 2x častěji u mužů než u žen. Tento jev nemůže být vysvětlen pouze infekcí HP. Analýzy ukázaly, že poměr incidence karcinomu žaludku u mužů oproti ženám se zvyšuje s věkem, vrchol je v 60 letech, potom klesá. (20) Vysoký poměr je způsoben tím, že tento typ nádoru

se u mužů vyskytuje až o 10-15 let dříve než u žen, zatímco prevalence u žen progresivně narůstá po 60 letech (menopauza). Nejvíce logickým vysvětlením pro tento jev je hormonální aktivita žen. V italské studii (16) 339 žen s karcinomem po menopauze byl zjištěn inverzní vztah k trvání fertility a pozdnímu věku menopauzy. Předpokládá se, že estrogény hrají proktivní úlohu v rozvoji karcinomu. V našem souboru 65 karcinomů je 28 intestinálního typu u mužů a 21 u žen.

Dvanácterníkový vřed nechrání před vznikem karcinomu žaludku, ačkoliv je mnohem méně častý než bychom předpokládali. (21) V našem souboru pacientů s karcinomem žaludku udávalo 8 pacientů v minulosti vředovou chorobu duodena.

Závěr

Prokázali jsme statisticky významně vyšší prevalenci protilátek proti invazivním kmenům HP

- u pacientů s karcinomem žaludku než u kontrolního souboru

Neprokládali jsme statisticky významný rozdíl v prevalenci protilátek proti agresivním kmenům HP

- ve vztahu k lokalizaci nádoru v distální nebo v proximální části žaludku

- ve vztahu k histologickému typu karcinomu (intestinálním verus karcinom difúzní).

Naše výsledky jsou vzhledem k omezenému počtu pacientů v souboru zatíženy chybou malých čísel. Přesto se zdá, že kmeny produkující cytotoxiny mají z hlediska patogeneze svůj význam. V české odborné literatuře nebyl, pokud víme, podobný soubor dosud publikován.

Literatura

1. Apostolopoulos P., Vafiadis- Zouboulis I., Tzivras M. et al: *Helicobacter pylori* infection in Greece: the changing prevalence during a ten year period and its antigenic profile, *BMC Gastroenterol*, May 2002; 2 (1):11
2. Atherton J. C.: *Helicobacter pylori* virulence factors. *BrMed Bull*, 1998, 54:105-120
3. Blaser M. J.: Role of vac A and cag A locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther*, Sci USA 2000;97:7533-7538
4. Brenner H., Arndt V., Bode G., Stegmaier C. et al: Risk of gastric cancer among smokers infected with *Helicobacter pylori*, *Int J Cancer* 2002 Mar 20,98(3):446-9
5. Correa P.: Human gastric carcinogenesis: multistep and multifactorial process. *Cancer Res* 1992;52:6735
6. Dítě P., Novotný I., Hep A. et al: Prevalence infekce *Helicobacter pylori* v regionu Jižní Morava, Miniinvazivní terapie, 1997, 2; 6:44-46
7. Dítě P., Hep A., Dolina J. et al: Prevalence *H.pylori* v České republice-region jižní Morava. *Vnitřní Léč*, 1998;44(3):132-134
8. Ernst P. B., Pecquet S.: Interactions between *Helicobacter pylori* and the local mucosal immune systém. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1991;187:56-64
9. Figueroa G., Troncoso M., Toledo M. S., Faudez G., Acuna R.: Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* Cas A and Cag A and gastric diseases in Chile, *J Med Microbiol* 2002 Apr;51 (4):300-4
10. Fixa B., Komárková O., Melichar B. a spol.: Výskyt infekce *Helicobacter pylori* u české dospělé populace. *Česká a Slov. Gastroenterologie*, 49,1995; 3:83-85
11. Houghton J., Fox J. G., Wang T.c.: Gastric cancer: laboratory bench to clinic, *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Apr;17(4):495-502
12. Jirásek V.: Karcinom žaludku, in Mařatka a spol.: *Gastroenterologie*, Karolinum 1999
13. Kapičková M., Šachlová M.: Invazivní kmeny *H. Pylori* u onkologických pacientů a jejich rodinných příslušníků. 34. Dni klinické mikrobiologie. Tatranská Lomnica, 3. - 5. 5. 2001, *Správy klinické mikrobiologie*, s. 71.
14. Miwa H., Go M. F., Sato N.: *H.pylori* and gastric cancer: the Asian enigma, *Am J Gastroenterol* 2002 May; 97 (5):1106-12

15. Nakamura M., Hamura K., Kamada T. et al: Cigarette smoking promotes atrophic gastritis in *Helicobacter pylori*-positive subjects. *Dig.Dis. and Sci* 47,3: 675-681
16. Palli D., Cipriani F., Decarli A., Galli M. et al: Reproductive history and gastric cancer among postmenopausal women. *Int J Cancer* 1994;56:812-5
17. Papa A., Danese S., Sgambato A., Ardito R. et al: Role of *Helicobacter pylori* CagA+ infection in determining oxidative DNA damage in gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2002, Apr37 (4): 409-13
18. Pereira L. P., Waisberg J., Andre E. A. et al: Detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer, *Arg Gastroenterol* 2001 Oct-Dec; 38 (4):240-6
19. Sipponen P.: Gastric cancer: pathogenesis, risks, and prevention, *J Gastroenterol*, 2002, Suppl.13: 39-44
20. Sipponen P., Hyvarinen H., Seppala K., Blaser M. J.: Review article: pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12(suppl 1) 61-71
21. Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J., Ihmaki T. et al: Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross sectional data. *Int J Cancer* 1985;35:173-7
22. Takahashi S.: Long-term *Helicobacter pylori* infection and the development of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan, *H.Gastroenterol.*, 2002;37 Suppl 13:24-7
23. Tamura G., Kihana T., Nomura K. et al: detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-stranded conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991,51:3056-8
24. Yamaguchi N., Kakizoe T.: Synergistic interaction between *Helicobacter pylori* gastritis and diet in gastric cancer, *lancet Oncol* 2001 Feb,2(2):88-94
25. Yamaji Y., Mitsushima T., Ikuma H. et al: Weak response of *Helicobacter pylori* antibody is high risk for gastric cancer: a cross-sectional study of 10 234 endoscoped Japanese. *Scand J Gastroenterol* 2002 Feb,37(2):148-53
26. Yamaoka Y., Kwon D. H., Graham D. Y.: A mr 34.000 proinflammatory outer membrane protein (oip A) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 2000;97:7533-7538